

**Untersuchungen zur pharmakologischen Modulation des
depolarisationsinduzierten Calciumeinstroms primärer
pankreatischer β -Zellen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Nele Seemann geb. Görgler
aus Hannover

1. Referent: Prof. Dr. Ingo Rustenbeck

2. Referent: Prof. Dr. Sönke Behrends

eingereicht am: 13.01.2021

mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.04.2021

Druckjahr 2021

VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Belz M., Willenborg M., **Görgler N.**, Hamada A., Schumacher K., Rustenbeck I.: Insulinotropic effect of high potassium concentration beyond plasma membrane depolarization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306(6): E697-E706 (2014)

Seemann N., Welling A., Rustenbeck I.: The inhibitor of connexin Cx36 channels, mefloquine, inhibits voltage-dependent Ca^{2+} channels and insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 472: 97-106 (2018)

Tagungsbeiträge

Görgler N., Belz M., Willenborg M., Schumacher K., Rustenbeck I.: Insulinotropic effect of high potassium concentration beyond plasma membrane depolarization. (Poster) 49. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Berlin (2014); *Diabetologie und Stoffwechsel* 9 (S01)

Görgler N., Willenborg M., Schumacher K., Rustenbeck I.: Diazoxide as a tool to investigate metabolic amplification of insulin secretion – a reconsideration. (Vortrag), 50th annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Wien (2014); *Diabetologia* 57 (Suppl1): S64

Görgler N., Willenborg M., Schumacher K., Welling A., Rustenbeck I.: Effects of K^+ depolarization on insulin secretion and beta cell Ca^{2+} influx. (Vortrag) 12th German Pancreatic Islet Workshop, Bremen (2015)

Görgler N., Willenborg M., Schumacher K., Welling A., Rustenbeck I.: Modification of the Ca^{2+} influx pattern of the pancreatic beta cell by high extracellular potassium. (Poster) 50. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Berlin (2015); *Diabetologie und Stoffwechsel* 10 (S01)

Görgler N., Willenborg M., Schumacher K., Welling A., Rustenbeck I.: Beta cell action potentials and Ca^{2+} currents during K^{+} depolarization. (Poster) 51st annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Stockholm (2015); Diabetologia 58 (Suppl 1): S208

Görgler N., Welling A., Rustenbeck I.: Mefloquine, a useful tool to investigate hemichannel function in pancreatic beta cells? (Poster) 51. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Berlin (2016); Diabetologie und Stoffwechsel 11 (S01)

Seemann N., Welling A., Rustenbeck I.: The inhibitor of connexin 36 hemichannels, mefloquine, affects K_{ATP} channels and L-type Ca^{2+} channels in pancreatic beta cells. (Poster) 52nd annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes, München (2016); Diabetologia 59 (Suppl 1): S191–S192

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2013 bis Dezember 2020 am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Ingo Rustenbeck.

Dafür möchte ich mich bei Ihnen, Herr Rustenbeck, ganz herzlich bedanken - sowohl für die Bereitstellung dieses ausgefallenen und anspruchsvollen Arbeitsplatzes, der mich u. a. gelehrt hat, mit teils deprimierenden Rückschlägen umzugehen, als auch für die Möglichkeit mich bei verschiedenen Gelegenheiten, wie dem Forschungsaufenthalt in München oder diversen Kongressen fortzubilden. Besonderen Dank schulde ich Ihnen für die geduldige und dennoch immer aufmerksame und zuverlässige Betreuung auch lange nach der Beendigung meiner praktischen Arbeiten.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Sönke Behrends für die Erstellung des Zweitgutachtens, sowie Herrn Prof. Conrad Kunick für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission. Danke auch an Prof. Stephan Scherneck für das Interesse an meiner Arbeit und die Teilnahme an der überaus angenehmen Disputation.

Vielen Dank, Frau Dr. Andrea Welling und Erwin Vu von der TU München, für die Gastfreundschaft und dass ich bei Ihnen die Arbeit mit dem EPC9 erlernen durfte.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei unseren TAs, insbesondere bei Sabine Warmbold, sowie bei Angela Hahlbohm und Verena Lier-Glaubitz für ihre Unterstützung und die fröhliche Zusammenarbeit im Labor.

Ein großer Dank geht an meine vielen lieben und motivierenden Kollegen, die sowohl fachlich als auch persönlich großartige Menschen sind. Kirstin, Dennis, Torben, Mai, Anne, Julia und ihr allen anderen, es war mir eine Ehre mit Euch zu arbeiten, Kongresse zu besuchen und Euch als Freunde gewinnen zu dürfen! Zudem möchte ich mich bei Dr. Hany Ghaly, Dr. Michael Willenborg und Dr. Michael Belz für die interessanten Vorarbeiten sowie die Zurverfügungstellung ihrer unveröffentlichten Daten bedanken.

Mein allergrößter Dank aber geht an meine Familie, meinen lieben Mann Lasse, der mich in den Jahren – von der Arbeit im Labor bis zur Fertigstellung der Dissertation – immer unterstützt und alles möglich gemacht hat, und an meine tollen Kinder, die meine größte Motivation waren, diese Doktorarbeit zu vollenden.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|------------|
| VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION | I |
| DANKSAGUNG | III |
| INHALTSVERZEICHNIS..... | IV |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 DIE „VOLKSKRANKHEIT“ DIABETES | 1 |
| 1.2 ZUR STRUKTUR DES ENDOKRINEN PANKREAS | 5 |
| 1.3 ZUR FUNKTION DER B-ZELLEN..... | 9 |
| 1.4 PHARMAKOLOGISCHE WERKZEUGE IN DER INSULINSEKRETIONSFORSCHUNG..... | 17 |
| 2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG | 22 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 23 |
| 3.1 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND ZELLKULTURMEDIENTEN | 23 |
| 3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN UND ALLGEMEINE GERÄTE | 25 |
| 3.3 STAMMLÖSUNGEN | 26 |
| 3.4 LÖSUNGEN UND MEDIEN..... | 29 |
| 3.5 PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG INTAKTER INSELN UND EINZELNER B-ZELLEN | 34 |
| 3.6 PATCH-CLAMP-VERSUCHE..... | 39 |
| 3.7 MIKROFLUORIMETRISCHE MESSUNGEN | 57 |
| 3.8 MESSUNGEN DER INSULINSEKRETIONSRATE | 65 |
| 3.9 MESSUNGEN DES ADENINNUCLEOTIDGEHALTES | 68 |
| 3.10 STATISTIK | 69 |
| 4 ERGEBNISSE..... | 70 |
| 4.1 EINFLUSS HOHER KALIUMKONZENTRATIONEN AUF DAS CALCIUMSIGNAL DER B-ZELLE | 70 |
| 4.2 UNTERSUCHUNGEN ZU DEN EFFEKTEN VON MEFLUQUIN AUF MEMBRANPOTENTIAL, CALCIUMEINSTROM UND INSULINSEKRETION | 80 |
| 4.3 BEEINFLUSSUNG DER B-ZELLFUNKTION DURCH DIAZOXID | 94 |
| 5 DISKUSSION..... | 99 |
| 5.1 DIE KALIUMDEPOLARISATION VERSTÄRKT DEN CALCIUMEINWÄRTSSTROM, ABER NICHT ÜBER EINE DIREKTE INTERAKTION MIT L-TYP CALCIUMKANÄLEN | 99 |
| 5.2 MEFLUQUIN BEEINFLUSST DIE INSULINSEKRETION DURCH BLOCKADE ELEMENTARER STRUKTUREN DER B-ZELLE | 107 |
| 5.3 DER K_{ATP} -KANALÖFFNER DIAZOXID HEMMT UNTER PHYSIOLOGIENAHEN BEDINGUNGEN DIE GLUCOSE-INDUZIERT INSULINSEKRETION DURCH STÖRUNG DER MITOCHONDRIENFUNKTION | 114 |
| 6 ZUSAMMENFASSUNG..... | 118 |

| | |
|------------------------------------|------------|
| LITERATURVERZEICHNIS..... | 121 |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 138 |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 140 |
| LEBENS LAUF | 143 |

1 EINLEITUNG

1.1 Die „Volkskrankheit“ Diabetes

Die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus wird zu den großen Volkskrankheiten gezählt. Anders als bei anderen Volkskrankheiten wie z.B. kardiovaskulären oder Krebserkrankungen gehört der Diabetes mellitus zwar nicht zu den primären Todesursachen, dennoch verstirbt ein Großteil der Patienten trotz sinkender Mortalitätsrate an den typischen Folgeerkrankungen. Besonders letal sind dabei sowohl die diabetesassoziierte Makroangiopathie, welche das Herzinfarkt- und Schlaganfallrisiko deutlich erhöht, als auch ein Nierenversagen in Folge der diabetesspezifischen Mikroangiopathie (Emerging Risk Factors Collaboration 2011; Jacobs et al. 2017; Rustenbeck und Joost 2017).

Zudem sind nach aktuellen Schätzungen etwa 7,3 Mio. Menschen in Deutschland an Diabetes mellitus erkrankt, was knapp 9 % der Bevölkerung entspricht, bei einer geschätzten Dunkelziffer von weiteren 2 Mio. bisher nicht diagnostizierten Diabetikern und einer stetig steigenden Inzidenzrate. Die meisten der Patienten (ca. 6,9 Mio.) leiden dabei an einem Diabetes mellitus Typ 2, ein deutlich geringerer Anteil ist vom Typ 1 betroffen. Eine Hochrechnung aus dem Jahr 2019 prognostiziert, dass die Prävalenz des Diabetes Typ 2 in Deutschland bis zum Jahre 2040 auf bis zu 12 Mio. ansteigen könnte (Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2020; Tönnies et al. 2019).

Laut Arzneiverordnungs-Report (Schwabe et al. 2019) erreichten die Kosten der verschriebenen Antidiabetika im Jahr 2018 mit 2,4 Mrd. € zu Lasten der GKV Rang 3 der umsatzstärksten Arzneimittel in Deutschland. Im Gegensatz zu den Rängen 1 (Onkologika) und 2 (Immunsuppressiva) war dies aber nicht die Folge der hohen Einzeldosiskosten, sondern der etwa 10-fach höheren Anzahl der verschriebenen Tagesdosen. Bei der genannten Summe sind die Kosten der Behandlungen durch Diabetologen und Diabetesberater sowie der Folgeerkrankungen noch nicht berücksichtigt.

In Anbetracht dieser wirtschaftlichen Aspekte, vor allem aber im Interesse der vielen Patienten mit Diabetes mellitus besteht weiterhin großer Bedarf an zielgerichteter, effektiver diabetologischer Forschung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag für diese Forschung leisten.

1.1.1 *Diabetes mellitus*

Der Begriff Diabetes (von altgr. *διαβαίνειν* (*diabainein*) = passieren) beschreibt zunächst das allgemeine Symptom einer vermehrten Wasserausscheidung (Polyurie). Es gibt verschiedene Krankheitsbilder mit diesem Leitsymptom. Das mit Abstand häufigste ist das des Diabetes mellitus.

Diabetes mellitus ist definiert als „Sammelbegriff für heterogene Störungen des Stoffwechsels, deren Leitbefund die chronische Hyperglykämie ist. Ursache ist entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine gestörte Insulinwirkung oder meist beides.“ (Petersmann et al. 2019, DDG-Praxisempfehlung)

Daher kommt auch der lateinische Beiname *mellitus* = honigsüß. Bevor andere Diagnosemethoden wie die Bestimmung des Blutzuckers etabliert waren, wurde die Krankheit durch Geschmacksprobe festgestellt. Die hohen Zuckerkonzentrationen im Blut bzw. Primärharn können von den Nieren nicht mehr vollständig resorbiert werden, da die entsprechenden Transporter abgesättigt sind, wodurch der Urin einen süßlichen Geschmack annimmt.

2019 veröffentlichte die WHO folgende Klassifikation der Diabetes-Typen:

- ❖ *“Type 1 diabetes* *β-cell destruction (mostly immune mediated) and absolute insulin deficiency*
- ❖ *Type 2 diabetes* *β-cell dysfunction and insulin resistance*
- ❖ *Hybrid forms of diabetes* *Slowly evolving, immune mediated diabetes of adults*
 Ketosis-prone type 2 diabetes
- ❖ *Other specific types* *Monogenic defects of β-cell function or insulin action*
 Diseases of the exocrine pancreas
 Endocrine disorders
 Drug- or chemical-induced diabetes
 Infection related diabetes
 Uncommon specific forms of immune-mediated diabetes
 Other genetic syndromes associated with diabetes
- ❖ *Unclassified diabetes* *Category should be used temporarily when there is not a clear diagnostic category, especially close to the time of diagnosis*
- ❖ *Hyperglycaemia first detected during pregnancy*
 - *Diabetes in pregnancy* *Type 1 or type 2 diabetes first diagnosed during pregnancy*
 - *Gestational diabetes* *Hyperglycaemia below diagnostic thresholds for diabetes in pregnancy”*

Die Definition und die Klassifikation machen klar, dass die Krankheit Diabetes mellitus verschiedene Ursachen haben kann, am Ende aber doch auf dasselbe Problem hinausläuft: Die unzureichende oder fehlende Insulinwirkung, entweder durch relativen oder absoluten Insulinmangel oder aufgrund verringerter Sensitivität der Insulinrezeptoren (Rustenbeck und Joost 2017).

Dies hat akut vor allem einen Einfluss auf den Glucosetransport, da Insulin zum Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme den Einbau von in Vesikeln gespeicherten GLUT4-Transportern in die Zellmembran fördert. Der über die Nahrung aufgenommene Zucker gelangt ins Blut, kann bei fehlendem Insulin aber von dort nicht in ausreichendem Maße in die Zellen (V.a. Skelettmuskel und Fettgewebe) aufgenommen und genutzt bzw. eingelagert werden. Hohe postprandiale Blutzuckerspitzen sind die Folge. Doch hat Insulin weitere Wirkungen, sowohl im Kohlehydrat- als auch im Lipid- sowie Proteinstoffwechsel. Indem es anabole Stoffwechselvorgänge wie die Glykogensynthese, Lipogenese, Aminosäuretransport und Proteinsynthese stimuliert, werden sämtliche Nährstoffe in den Zellen eingespeichert. Gleichzeitig hemmt es die katabolen Mechanismen, zu denen Gluconeogenese, Glykogenolyse, Lipolyse sowie der Abbau von Proteinen gehören. Zwischen den Mahlzeiten wird es in Balance mit dem blutzuckersteigernden Gegenspieler Glucagon freigesetzt, um diese Stoffwechselvorgänge und damit den Blutzuckerspiegel weiterhin fein zu regulieren.

Bleiben diese Wirkungen im Falle einer Diabeteserkrankung aus, hat dies neben der chronischen Hyperglykämie zahlreiche Folgen. Die pathologisch hohe Konzentration von Zucker im Urin führt zu einer starken osmotischen Diurese und dadurch zu einer Austrocknung bzw. starkem Durst der Patienten. Außerdem geht der für den Körper wertvolle Zucker verloren. Das Gehirn ist auf Glucose als primären Energielieferant angewiesen. Der Körper muss daher auf seine Energiereserven zurückgreifen. Insgesamt überwiegen die katabolen Stoffwechselvorgänge, Muskel- und Fettgewebe können nicht erhalten werden. Dies führt im Falle eines absoluten Insulinmangels zur starken Abmagerung der Patienten. Die hohen Blutglucosekonzentrationen schädigen die Gefäße, wodurch es zu den klassischen Mikroangiopathien (betrifft Augen, Nieren, Nervensystem) und Makroangiopathien (Herz, Gehirn, Arterien, entspricht der Atherosklerose) kommt. Folgen der Mikroangiopathien sind Nierenversagen, Erblindung, Empfindungsstörungen. Die Durchblutungsstörungen der Gefäße in den Füßen in Kombination mit den Empfindungsstörungen bedingen das diabetische Fußsyndrom, welches nicht selten in Amputationen endet. Bei extrem hohen Blutzuckerkonzentrationen bzw. Mangel an Zucker in den Zellen kommt es durch verstärkte Lipolyse und Gluconeogenese zur Bildung saurer Ketonkörper und so zur

diabetischen Ketoazidose, die zum diabetischen Koma führt und im unbehandelten Fall meist tödlich verläuft.

Diese dramatischen Bilder beschreiben vor allem die Folgen des unbehandelten Diabetes mellitus. Seit der Entdeckung des Insulins und ersten erfolgreichen Therapien mit tierischem Insulin durch Frederick Banting und Charles Best in den 1920er Jahren hat die Diagnose Diabetes mellitus deutlich an Schrecken verloren. Die Mortalitätsrate konnte drastisch gesenkt werden, da der mittelfristige Tod aufgrund der unaufhaltbaren Abmagerung durch die Insulinsubstitution verhindert wird und auch die Gefahr der diabetischen Ketoazidosen stark reduziert ist. Da eine perfekte Blutzuckereinstellung dennoch kaum möglich ist, sind nun die langfristigen Komplikationen als Todesursache in den Vordergrund getreten.

Die weitere Forschung in der Diabetologie machte die gentechnische Produktion besser verträglichen Humaninsulins und der gezielt kurz- bzw. langwirksamen Analoga möglich. Hinzu kam die Entwicklung der (überwiegend) oralen Antidiabetika, die die Blutzuckerkontrolle der nicht insulinpflichtigen Diabetespatienten unterstützen sollen.

Auch wenn den Patienten mit den vielfältigen Therapiemöglichkeiten bereits sehr viel Leid erspart bleiben kann, so wird hier doch weiterhin intensiv nach Verbesserungen und alternativen Therapieansätzen gesucht. Dafür ist es notwendig, die komplexe Physiologie der insulinproduzierenden β -Zellen noch besser zu begreifen, um dadurch Einfluss auf sie nehmen zu können.

1.2 Zur Struktur des endokrinen Pankreas

1.2.1 Die Langerhans'schen Inseln

Die humane Bauchspeicheldrüse (Pankreas) ist ein etwa 14–18 cm langes und 50–100 g schweres Drüsenorgan, das quer unterhalb des Magens liegt und über einen Ausführungsgang in den Zwölffingerdarm (Duodenum) mündet. Streng genommen müsste man von zwei Organen sprechen, da das Pankreas funktionell in zwei Einheiten unterteilt wird: das exokrine Pankreas, welches Verdauungsenzyme sezerniert und über den genannten Ausführungsgang in den Dünndarm einleitet, sowie das endokrine Pankreas, welches Hormone produziert, die an das Blut abgegeben werden (Dolenšek, Rupnik, und Stožer 2015; Vaupel, Schaible, und Mutschler 2015).

Letzteres wird auch als das Inselorgan bezeichnet, da die Hormone in spezifischen Zellen produziert werden, die zu großen Zellverbänden zusammengelagert und wie Inseln im gesamten Pankreas verteilt sind. Diese Inseln haben einen Durchmesser von 75–250 μm und machen etwa 2–3 % des gesamten Pankreas aus. Mit eigenen Blutgefäßen versorgt sind sie so nicht nur funktionell, sondern auch strukturell vom umliegenden, exokrinen Gewebe isoliert. 1869 wurden sie von Paul Langerhans entdeckt und nach ihm benannt.

Die humanen Langerhans'schen Inseln setzen sich aus folgenden Zelltypen zusammen:

- ❖ α -/ A-Zellen, Hormon: Glucagon, Anteil an gesamten Inselzellen ca. 30 %
- ❖ β -/ B-Zellen, Insulin, ca. 60 %
- ❖ γ -/ PP-Zellen, pankreatisches Polypeptid, < 5 %
- ❖ δ -/ D-Zellen, Somatostatin, 5–8 %
- ❖ ϵ - Zellen, Ghrelin, fetal / neonatal ca. 10 %, adult nur noch vereinzelte Zellen

Diese Zusammensetzung variiert zwischen verschiedenen Spezies. Bei Mäusen zum Beispiel ist der Anteil an β -Zellen im Vergleich zum Menschen deutlich erhöht. Zudem handelt es sich bei Mausinseln um kompakte Zellverbände deren Kern fast ausschließlich aus β -Zellen besteht, während die anderen Zelltypen die „Hülle“ der Inseln bilden. Die humanen Inseln sind dagegen bei im Schnitt gleicher Größe deutlich zerfurchter, bilden kleine Läppchen, die sich um ein großlumiges Gefäßsystem herum falten. Dennoch gibt es auch hier ein Kern-Mantel-Muster bei der Verteilung der verschiedenen Zelltypen, bei dem die β -Zellen nach außen und zu den Gefäßen hin

von α - und δ -Zellen eingerahmt sind. Dadurch ergeben sich trotz des zusammenhängenden β -Zell-Netzwerks deutlich mehr heterogene Zell-Zell-Kontakte. Diese Unterschiede dürfen in der experimentellen Forschung, bei der häufig auf Nagermodelle zurückgegriffen wird, nicht außer Acht gelassen werden. (Bosco et al. 2010; Dolenšek et al. 2015; Kilimnik et al. 2012; Wierup et al. 2002).

Denn die genannten Zell-Zell-Kontakte spielen eine besondere Rolle für die Funktionstüchtigkeit des endokrinen Pankreas; d.h. in erster Linie für die Regulierung des Blutzuckerspiegels. Heterogene Zell-Zell-Kontakte führen über parakrine Signale zu einer effektiven gegenseitigen Regulation der verschiedenen Zelltypen. So hemmen β -Zellen über Insulin benachbarte α -Zellen an der Glucagonsekretion, um akut die entgegengesetzte, blutzuckersteigernde Wirkung dieses Hormons zu unterdrücken, fördern dafür aber die längerfristige Glucagon-Genexpression. Gleichzeitig werden ATP und γ -Aminobuttersäure (GABA) ausgeschüttet, welche auf autokrinem Wege die Insulinfreisetzung noch verstärken. α -Zellen unterstützen die Insulinsekretion durch Freisetzung von Glucagon und Acetylcholin (ACh). Das ACh stimuliert außerdem die δ -Zellen zur Freisetzung von Somatostatin, einem Hormon mit allgemein hemmender Wirkung (auch SIH oder GHIH, *somatotropin- bzw. growth hormone-inhibiting hormone*). Dieses senkt sowohl die Insulin- als auch die Glucagonsekretion. Das Ghrelin (von *growth hormone-releasing hormone*) aus den ϵ -Zellen hemmt wiederum als physiologischer Gegenspieler die Somatostatinausschüttung, aber auch die Insulinsekretion (Arrojo e Drigo et al. 2015; Egido et al. 2002).

1.2.2 Die β -Zelle und ihre Connexine

Doch auch die homogenen Zell-Zell-Kontakte vor allem der β -Zellen sind von großer Bedeutung für die Physiologie der Pankreasinseln. Bereits 1975 wurden mithilfe der Gefrierbruchtechnik in humanen Langerhans'schen Inseln *gap junctions* nachgewiesen (Orci et al. 1975). *Gap junctions* entstehen durch die Kopplung zweier Connexone benachbarter Zellen und stellen eine Verbindung zwischen deren Cytosol her, wodurch ein unselektiver Austausch von Ionen sowie hydrophiler Moleküle mit einem Durchmesser von bis zu 20 Å ermöglicht wird (Loewenstein 1981). Connexone sind wiederum aus sechs Connexinen aufgebaut, die zusammen einen Kanal in der Zellmembran formen (Abb. 1.1).

Verschiedene Gruppen zeigten anhand von elektrophysiologischen Versuchen, dass β -Zellen über *gap junctions* elektrisch miteinander gekoppelt sind (Eddlestone et al.

1984; Meissner 1976; Zhang et al. 2008). Diese Kopplung konnte anschließend mit einem gleichmäßigen Oszillieren der cytosolischen Calciumkonzentration der gesamten Insel in Verbindung gebracht werden, deren Auftreten obendrein synchron mit den elektrisch aktiven Phasen der β -Zellen verlief (Benninger et al. 2008; Santos et al. 1991). Allerdings zeigte sich auch hier der Unterschied zwischen der Inselanatomie von Maus und Mensch, indem die synchronisierte Ca^{2+} -Oszillation nicht in den komplexer aufgebauten humanen Inseln zu beobachten war (Cabrera et al. 2006). Hiermit wurde erklärt, warum bei murinen, nicht aber humanen Inseln eine pulsatile Insulinsekretion gemessen wird. Dies trifft allerdings nur auf die *in vitro*-Situation zu. *In vivo*, also beim lebenden Menschen, ist durchaus eine pulsatile Insulinsekretion festzustellen, was unter anderem auf eine Wirkung der Inkretine (GIP und GLP-1) zurückgeführt wird (Hodson et al. 2013; Pørksen et al. 2002).

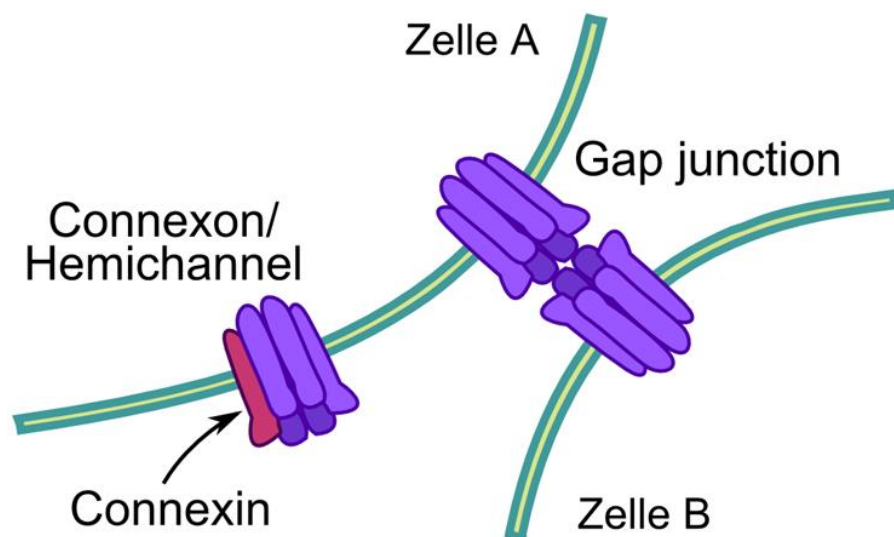


Abbildung 1.1: Hemichannels und Gap junctions Sechs zusammengelagerte Connexinmoleküle bilden ein Connexon. Übernimmt ein Connexon allein bereits eine physiologische Aufgabe als Membrankanal, wird dieser Hemichannel genannt. Gap junctions entstehen, wenn zwei Connexone benachbarter Zellen sich verbinden und einen durchgehenden Kanal ausbilden.

Serre-Beinier et al. (2000) wiesen nach, dass das Connexin vom Subtyp Cx36 innerhalb der Langerhans'schen Inseln quasi ausschließlich von β -Zellen exprimiert wird. Dies untermauerte die Vermutung, dass innerhalb der Inseln nur β -Zellen elektrisch miteinander gekoppelt sind. Untersuchungen an Pankreasinseln von Cx36-*Knockout*-Mäusen bestätigten, dass dieser Connexin-Subtyp allein für die Ausbildung der β -Zell gap junctions verantwortlich ist (Ravier et al. 2005). Speier et al. (2007)

zeigten ebenfalls an einem Cx36-*Knockout*-Modell, dass der Verlust der *gap junctions* zwar die synchrone Oszillation der cytosolischen Calciumkonzentration und der Insulinsekretion verschwinden lässt, dies aber keinen Einfluss auf die Glucose-induzierte Gesamtinsulinsekretion hat. Dafür waren einzelne β -Zellen deutlich schneller elektrisch erregbar und sprachen verstärkt auf schwache Glucosestimuli an, was eine erhöhte basale Sekretionsrate zur Folge hatte. Die elektrische Kopplung über *gap junctions* gleicht demnach die Membranpotentiale benachbarter β -Zellen aneinander an und hat in Bezug auf die Insulinsekretion eher eine allgemein regulierende Funktion.

Neuerdings sind aber auch die einzelnen, ungekoppelten Connexone mehr und mehr in den Fokus der Forschung gerückt und inzwischen wird ihnen eine eigene physiologische Rolle zugeschrieben. Da es sich bei diesen funktionellen Einheiten um halbe *gap junction*-Kanäle handelt, hat sich hier der Name „Hemichannels“ durchgesetzt (Abb. 1.1) (Evans, De Vuyst und Leybaert 2006; Goodenough und Paul 2003). Dank Studien an Hemichannels verschiedenster Connexin-Subtypen konnten konservierte Eigenschaften hinsichtlich ihrer Aktivierung bzw. Inaktivierung sowie der Leitfähigkeit identifiziert werden. So wird angenommen, dass diese Hemichannels im Allgemeinen unter dem Einfluss starker, supraphysiologischer Depolarisationen ($V \geq +40$ – 60 mV) oder verringerter extrazellulärer Konzentrationen divalenter Kationen (z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+}) öffnen, während sie in Anwesenheit bestimmter *gap junction*-Blocker (z.B. Mefloquin, Flufenaminsäure) inaktivieren. Im geöffneten Zustand weisen sie eine recht unselektive Ionenleitfähigkeit auf, entlassen cytosolisches ATP und Glutamat in den Extrazellulärraum und begünstigen die Aufnahme von Farbstoffen wie Lucifer Yellow oder Propidiumiodid (Fasciani et al. 2013; Mandal, Shahidullah und Delamere 2015; Scemes, Spray und Meda 2009; Spray, Ye und Ransom 2006).

Schock et al. (2008) schlossen aufgrund eines ATP-Verlustes nach Depolarisation kultivierter Neuronen, welcher durch *Knockdown* des hier ebenfalls vorhandenen Cx36 verhindert werden konnte, darauf, dass auch dieser Connexin-Subtyp physiologisch aktive Hemichannels ausbildet. Untersuchungen an Pankreasinseln von Cx36-*Knockout*- und Wildtyp-Mäusen, bei denen unter anderem die ATP-Konzentration in Ruhe sowie während starker Depolarisationen (70 mM KCl) beobachtet wurde, legten schließlich eine Hemichannelaktivität in β -Zellen nahe, die einen Einfluss auf den Nucleotidgehalt und damit auf die Insulinsekretion haben könnte (Pizarro-Delgado et al. 2014).

1.3 Zur Funktion der β -Zellen

1.3.1 Insulinsynthese und Speicherung in Sekretgranula

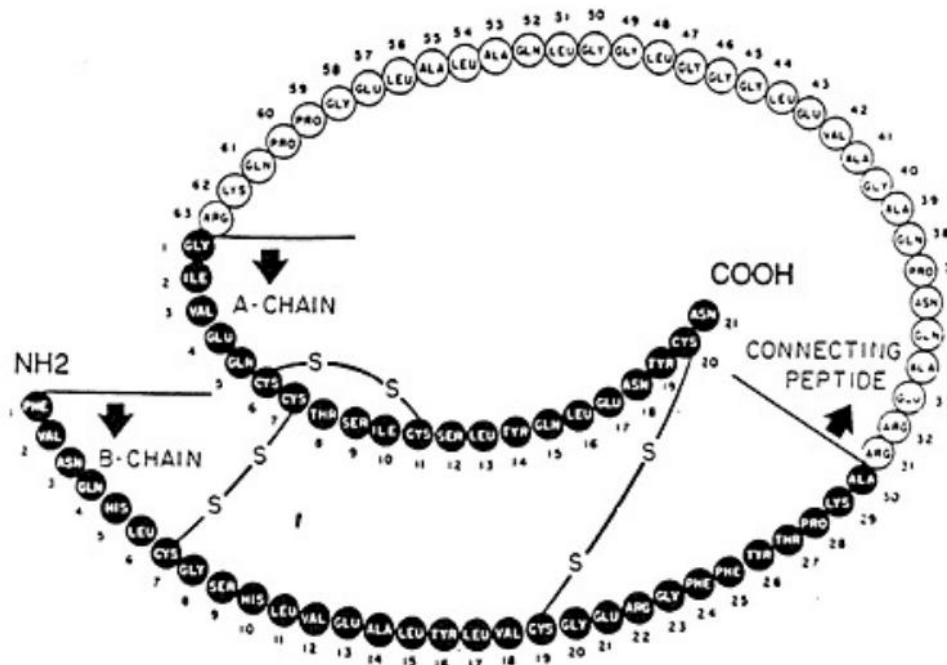


Abbildung 1.2: Primärstruktur von (Pro-)Insulin Das Proinsulinmolekül ist eine einzelsträngige Peptidkette, bei der B-Kette (30 AS), C-Peptid und A-Kette (21 AS) noch hintereinander hängen (vom N- zum C-Terminus). Die drei stabilisierenden Disulfidbrücken werden bereits in dieser Vorstufe ausgebildet. Nach Abspaltung des C-Peptids entsteht das zweisträngige Endprodukt Insulin (schwarz markierte AS). Hier ist Schweineinsulin dargestellt, welches sich allein in der Aminosäure B30 vom Humaninsulin unterscheidet (Alanin statt Threonin). (aus Weiss, Steiner, und Philipson 2000)

Insulin ist ein von den β -Zellen gebildetes Peptidhormon bestehend aus 51 Aminosäuren (AS) mit einem Molekulargewicht von etwa 5,8 kDa (Abb. 1.2). Es ist zusammengesetzt aus zwei Peptidketten, nämlich der A-Kette (21 AS) und der B-Kette (30 AS), welche über zwei Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Außerdem gibt es eine weitere Disulfidbrücke innerhalb der A-Kette (Ryle et al. 1955; Sanger und Thompson 1953; Sanger und Tuppy 1951). Nach der Aufschlüsselung dieser Primärstruktur durch Frederick Sanger und Kollegen – der ersten vollständigen Proteinsequenzierung überhaupt – gelang Donald F. Steiner und Kollegen ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Biosynthese. Demnach werden die zwei Peptidketten anders als bis dahin vermutet nicht parallel zusammengesetzt und anschließend über die Disulfidbrücken verbunden, sondern aus einer einkettigen Vorstufe gebildet, dem Proinsulin mit dem verbindenden C-Peptid (*connecting peptide*) (Steiner et al. 1967).

Nach Transkription des Insulingens, welches auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert ist, wird die mRNA an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Reticulums (ER) translatiert (Owerbach et al. 1980). Dabei entsteht zunächst das Präproinsulin, an dessen N-terminalem Ende ein zusätzliches Signalpeptid hängt. Dieses vermittelt den Eintritt in das ER-Lumen, wo es anschließend abgespaltet wird. Im ER erfolgt die Faltung des nun vorliegenden Proinsulins sowie die Ausbildung der Disulfidbrücken. Nach Passage des Golgi-Apparates wird es in Vesikeln verpackt, in deren saurem Milieu sich jeweils sechs Proinsulinmoleküle mit zwei Zinkionen zu einem löslichen Proinsulin-Zink-Komplex zusammenfinden. Durch das anschließende Herausschneiden des polaren C-Peptids entstehen die endgültigen Insulin-Zink-Hexamere, welche nun in einer stabilen, kristallinen Speicherform vorliegen (Rustenbeck und Joost 2017).

1.3.2 Insulinsekretion, vom Stimulus zur Exozytose

Die exozytotische Freisetzung des Insulins aus den Sekretgranula wird durch einen Komplex an Mechanismen ausgelöst, die unter dem Begriff Stimulus-Sekretions-Kopplung zusammengefasst werden. Der Stimulus ist dabei ein erhöhtes extrazelluläres Nährstoffangebot. Vornehmlich Glucose (Mensch ab ~3 mM, Maus ab ~5,5 mM), aber auch einige Aminosäuren können die Insulinsekretion ankurbeln (Hedekov 1980; Heissig et al. 2005; Henquin, Dufrane und Nenquin 2006).

Glucose als primärer, physiologischer Stimulus gelangt passiv über Glucosetransporter (Mensch GLUT1, Maus GLUT2) in die β -Zellen, und wird dort verstoffwechselt (Abb. 1.3) (McCulloch et al. 2011; Thorens 2015; De Vos et al. 1995). Im Rahmen der Glykolyse wird die Glucose zunächst im Cytosol zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut. Das Enzym, das den ersten Schritt, nämlich die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat katalysiert, ist die Glucokinase, die als Schrittmacherenzym des Glucosemetabolismus der β -Zellen gilt (Lenzen und Panten 1988; Meglasson und Matschinsky 1984). Nach Einschleusung des Pyruvats in die mitochondriale Matrix und Umwandlung in Acetyl-CoA, wird es über Citrat-Zyklus und anschließende oxidative Phosphorylierung vollständig zu CO_2 oxidiert und energiereiches ATP gewonnen.

Der resultierende Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration bzw. der ATP/ADP-Ratio führt zum Verschluss ATP-abhängiger Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle), welche im offenen Zustand zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials von etwa -70 mV beitragen (Ghosh et al. 1991; Meglasson et al. 1989). Diese Kanäle setzen sich aus

vier $K_{ir}6.2$ -Untereinheiten (*inwardly rectifying*), die die innere Kanalpore formen, sowie vier SUR1-Untereinheiten (*sulphonylurea receptor*), die einen äußeren Ring ausbilden, zusammen. Die SUR1-Untereinheiten sind Proteine aus der Familie der ABC-Transporter (*ATP binding cassette*) und damit nicht nur der Angriffspunkt der insulinotropen Sulfonylharnstoffe, sondern in erster Linie die regulierende Domäne, an die das ATP bindet, wodurch der Kanal verschlossen wird (Aguilar-Bryan et al. 1998; Aguilar-Bryan und Bryan 1999; Clement et al. 1997).

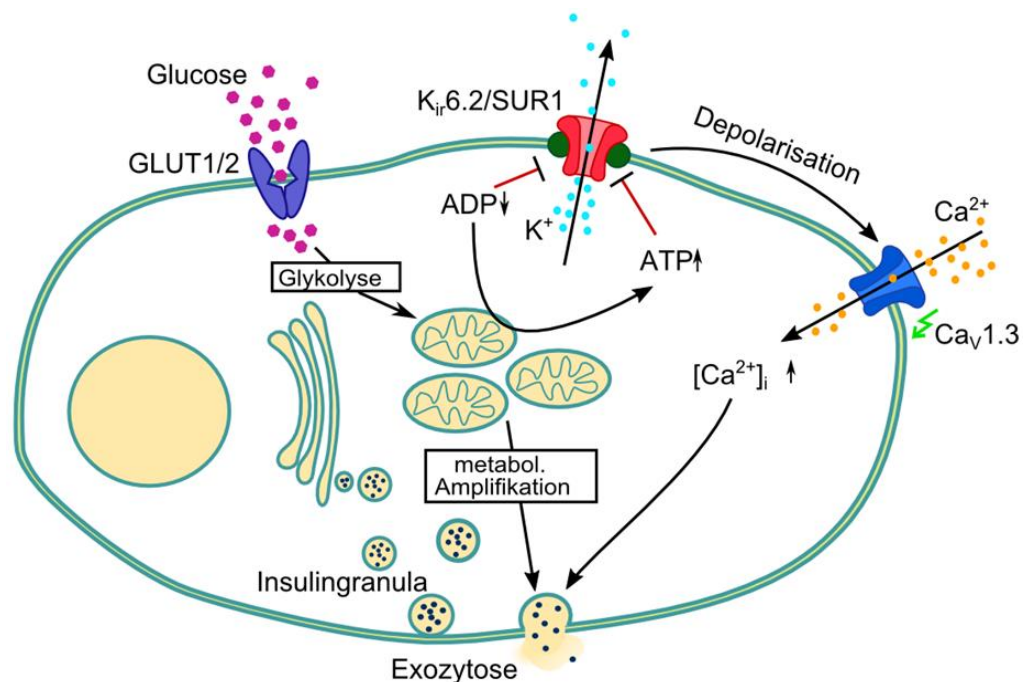


Abbildung 1.3: Mechanismen der Glucose-induzierten Insulinfreisetzung Glucose gelangt dank spezieller Transporter (Mensch GLUT1, Maus GLUT2) in das Cytosol der β -Zelle, wo sie im Rahmen der Glykolyse zu Pyruvat abgebaut wird. Dieses wird in den Mitochondrien vollständig oxidiert, wodurch letztendlich energiereiches ATP gewonnen wird. Die erhöhte intrazelluläre ATP/ADP-Ratio führt zum Verschluss der $K_{ir}6.2$ -Untereinheit der K_{ATP} -Kanäle und damit zur Depolarisation der β -Zellmembran. Infolgedessen öffnen spannungsgesteuerte L-Typ Calciumkanäle ($Ca_v1.3$). Der Anstieg der freien, cytosolischen Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) bewirkt zu guter Letzt die Exozytose der Insulingranula. Hinzu kommen bisher nicht vollends aufgeklärte Signale aus dem Glucosemetabolismus, die die Insulinsekretion noch weiter verstärken, die sogenannte metabolische Amplifikation.

Aufgrund der K_{ATP} -Kanalblockade depolarisiert die β -Zellmembran bis zu einem Schwellenpotential von etwa -35 mV, was wiederum zur Öffnung spannungsgesteuerter L-Typ Calciumkanäle (Mensch $Ca_v1.3$, Maus $Ca_v1.2$) führt (Braun et al. 2008; Rorsman und Trube 1986). Der daraus resultierende, weiter

depolarisierende Calciumeinwärtsstrom im Wechsel mit repolarisierenden, spannungs- und calciumabhängigen Kaliumauswärtsströmen wird in elektrophysiologischen Messungen in Form von Aktionspotentialen sichtbar. Der Anstieg der freien, cytosolischen Calciumkonzentration ist letztendlich das Signal, das die Exozytose der reifen Sekretgranula initiiert.

Spannungsabhängige Calciumkanäle (*voltage-dependent calcium channels*, VDCC, Ca_v) sind eine Gruppe von Kanälen mit einer hohen Selektivität für Ca^{2+} und Ba^{2+} -Ionen, die – wie der Name sagt – spannungsabhängig aktivieren und inaktivieren. Bei sehr ähnlicher molekularer Struktur (Abb. 1.4) werden sie abhängig von verschiedenen Eigenschaften in mehrere Gruppen unterteilt (Catterall 2011; Takahashi et al. 1987).

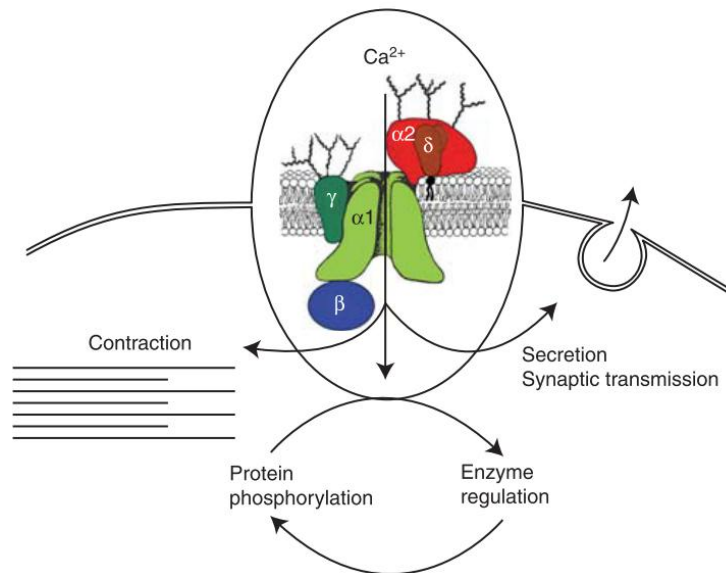


Abbildung 1.4: Struktur und Funktion spannungsabhängiger Calciumkanäle Der spannungsabhängige Calciumkanal ist ein Komplex, der aus vier bis fünf Untereinheiten zusammengesetzt ist: einer großen, transmembranären Untereinheit, die die zentrale Ionenpore formt (α_1), einer intrazellulären Untereinheit (β), einem extrazellulären Glykoprotein, das über eine Disulfidbrücke zu einer weiteren Untereinheit in der Membran verankert ist, ($\alpha_2\delta$ -Dimer) und einem kleineren transmembranären Glykoprotein (γ), das nur bei bestimmten Subtypen vorkommt. Die Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle ist in elektrisch erregbaren Zellen für verschiedenste physiologische Prozesse verantwortlich, wie z.B. die Stimulus-Kontraktions- und Stimulus-Sekretions-Kopplung, Enzymregulation, Proteinphosphorylierung oder Genexpression (modifiziert aus Catterall 2011).

Da gibt es die Dihydropyridin-sensitive Subfamilie Ca_v1 mit den Subtypen 1.1-1.4, die in vielen verschiedenen elektrisch erregbaren Zelltypen vorkommen und dort verschiedenste physiologische Prozesse regulieren. In sämtlichen Muskelzelltypen

sind sie für die Stimulus-Kontraktions-Kopplung verantwortlich sowie in exokrinen Zellen für die Stimulus-Sekretions-Kopplung, sie tragen zur synaptischen Signalübertragung bei und regulieren Genexpression und Enzymaktivitäten. Da sie nach Aktivierung lange geöffnet bleiben, werden sie unter dem Begriff L-Typ Calciumkanäle (*long lasting*) zusammengefasst und fallen zudem unter die Bezeichnung HVA (*high voltage activated*), weil sie erst bei verhältnismäßig hohen Spannungen, also starker Depolarisation öffnen (Catterall 2011; Yang and Berggren 2006).

Die weiteren Subfamilien dagegen haben deutlich eingeschränkte Funktionen. Die Vertreter der Familie Ca_v2 tragen aufgrund der Zellen, in denen ihre Aktivität zuerst beobachtet wurde, und aufgrund ihrer variierenden Sensitivität gegenüber verschiedener Toxine zwar abwechslungsreichere Bezeichnungen, dienen aber überwiegend der schnellen, neuronalen Erregungsübertragung. Dazu gehören der P/Q-Typ (in Purkinjezellen und anderen Kleinhirnneuronen, $Ca_v2.1$), der N-Typ (neuronal, $Ca_v2.2$) und der R-Typ (*residual*, $Ca_v2.3$). Bei den Ca_v2 -Kanälen handelt es sich entweder um IVA (*intermediate voltage activated*) oder ebenfalls HVA-Calciumkanäle (Randall and Tsien 1995).

Die Kanäle der Subfamilie Ca_v3 tragen wegen ihrer schnellen Inaktivierung allesamt den Titel T-Typ Calciumkanal (*transient opening*). Sie sind LVA-Kanäle (*low voltage activated*), öffnen also bereits bei relativ niedrigen Spannungen zwischen -70 und -50 mV, und sind für die schnelle und regelmäßige Depolarisation in rhythmisch feuernenden Zellen, wie bestimmten Neuronen oder Schrittmacherzellen verantwortlich. Besonders bekannt sind sie für ihre Aktivität in Kardiomyocyten (Catterall 2011; Hirano, Fozzard, and January 1989).

Der Beitrag weiterer VDCC zur Insulinsekretion wird intensiv diskutiert. So gibt es sowohl in murinen als auch humanen β -Zellen P/Q-Typ Calciumkanäle, welche den Exozytosevorgang wahrscheinlich über direkte Interaktion mit Synaptotagmin oder Proteinen des SNARE-Komplexes beeinflussen (s. unten). Außerdem exprimieren humane, nicht aber murine β -Zellen einen T-Typ Calciumkanal, der durch seine niedrige Aktivierungsspannung vermutlich das Erreichen des Schwellenpotentials begünstigt. Dem R-Typ Calciumkanal wurde eine besondere Rolle in Bezug auf die zweite Phase der Insulinsekretion zugeschrieben (s. unten). Da dieser Kanal in humanen β -Zellen allerdings nicht nachweisbar ist, kann dieser Einfluss allenfalls im Rahmen der Insulinsekretion von Mäusen in Betracht gezogen werden (Braun et al. 2008; Charvin et al. 1997; Göpel et al. 2004; Yang and Berggren 2005).

Die Mechanismen der Exozytose vom Andocken der Granula an die Plasmamembran bis hin zur Öffnung der Fusionspore und Freisetzung des Insulins entsprechen im Allgemeinen denen der neuronalen Transmitterfreisetzung. Dafür bedarf es einer Reihe von membrannahen Proteinen in der sogenannten aktiven Zone.

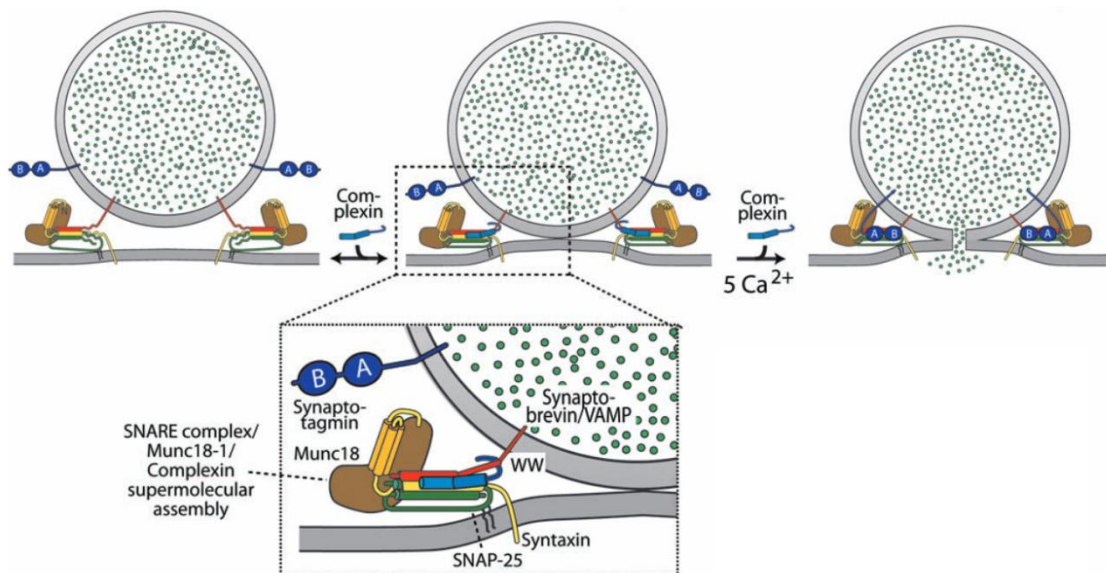


Abbildung 1.5: Mechanismen der Exozytose: Ausbildung des SNARE-Komplexes und Öffnung der Fusionspore Durch Zusammenlagerung der SNARE-Proteine Syntaxin, SNAP-25 (beide plasmamembranständig) und VAMP (vesikelmembranständig) wird der SNARE-Komplex gebildet, der das reife Sekretgranulum an der Plasmamembran fixiert. Dieser Zustand wird durch Munc18 und Complexin stabilisiert, bis ein Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration die eigentliche Exozytose initiiert. Dabei binden Calciumionen an Synaptotagmin, welches nun das Complexin verdrängt und die Ausbildung der Fusionspore bewirkt (modifiziert aus Maximov et al. 2009).

Ein Komplex aus Rab3 bzw. 27, zweier kleiner G-Proteine der Granulamembran, RIM (*Rab3-interacting molecule*), RIM-BP (*RIM-binding protein*), MUNC13 (*mammalian homologue of UNC13*), und einem spannungsabhängigen Calciumkanal (u.a. P/Q-Typ), welcher in der Plasmamembran verankert ist, fixiert zunächst das Granulum in Membrannähe und bringt es so in eine optimale Position zur Ausbildung des ternären SNARE-Komplexes (*SNAP Receptor*) (Kaeser et al. 2011). Dieser wiederum ist eine Zusammenlagerung des vesikulären „vSNARE“-Proteins VAMP-2 (*vesicle-associated membrane protein*), und der plasmamembranständigen „tSNARES“ (*target*) Syntaxin-1 und SNAP-25 (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein*). Durch Verschränkung der vier α -Helices (zwei von SNAP-25, eine von Syntaxin-1 und eine von VAMP-2) wird das Granulum noch näher an die Plasmamembran herangezogen

(Abb. 1.5) (Bruns und Jahn 2002; Söllner et al. 1993). MUNC18 und Complexin stabilisieren diesen Komplex vorübergehend, um eine unkontrollierte Freisetzung des Granulainhaltes zu verhindern (Maximov et al. 2009). Kommt es nach Stimulation der β -Zelle zum Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration, binden Calciumionen an Synaptotagmin in der Granulamembran. Dieses vertreibt das Complexin vom SNARE-Komplex, lagert sich selbst diesem an und löst so die Bildung der Fusionspore aus, wodurch das Insulin in den Extrazellulärraum abgegeben wird. (Lang 1999; Südhof 2013)

Die beschriebenen Mechanismen von der Glucoseaufnahme in die Zelle bis hin zum Anstieg der Calciumkonzentration gelten soweit als aufgeklärt und als grundlegend notwendig für die Insulinsekretion. Doch wurde inzwischen zweifelsfrei nachgewiesen, dass es weitere Mechanismen geben muss, die zusätzlich zur Membrandepolarisation die Sekretionsrate erhöhen. So konnten Panten et al. (1988) zeigen, dass Glucose und weitere Nährstoffe die Sekretionsrate in Anwesenheit eines maximal effektiven Sulfonylharnstoffs, also bei vollständiger K_{ATP} -Kanalblockade, weiter ansteigen lassen. Gembal et al. (1992) bestätigten diese Beobachtung, indem sie die β -Zellen hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen aussetzten, um eine depolarisationsinduzierte Insulinsekretion hervorzurufen, während die K_{ATP} -Kanäle mit Diazoxid im geöffneten Zustand gehalten wurden. Dadurch war es der Glucose nicht mehr möglich eine insulintrope Wirkung über K_{ATP} -Kanalblockade und weitere Membrandepolarisation zu entfalten. Dennoch kam es auch unter diesen Bedingungen zu einer weiteren Zunahme der Insulinsekretion durch Glucose. Es wird davon ausgegangen, dass bestimmte Zwischenprodukte des Glucosemetabolismus diese Sekretionssteigerung vermitteln; daher spricht man auch von der metabolischen Amplifikation. Henquin (2000) prägte die Begriffe *triggering pathway* für den grundlegenden, sekretionsauslösenden Weg über Membrandepolarisation und Calciumeinstrom sowie *amplifying pathway* für die sekretionssteigernden Signale aus dem Glucosestoffwechsel.

Das Phänomen der biphasischen Insulinsekretion ist seit den 1960er Jahren bekannt (Curry, Bennett und Grodsky 1968). Dabei kommt es in den ersten fünf Minuten nach Zugabe eines Glucosestimulus zu einem rasanten Anstieg der Sekretionsrate mit anschließendem Abfall auf beinahe basale Werte (1. Phase), auf den ein langsamerer, aber kontinuierlicher zweiter Anstieg folgt (2. Phase). Bisher gilt die allgemeine Ansicht, dass der *triggering pathway* für die erste Phase der Insulinsekretion verantwortlich ist, während die zweite Phase dem *amplifying pathway* zugeschrieben wird. Allerdings gibt es inzwischen deutliche Hinweise darauf, dass die metabolische Amplifikation bereits

in der ersten Phase der Insulinsekretion eine entscheidende Rolle spielt (Mourad, Nenquin und Henquin 2010).

Es wird intensiv daran geforscht, verantwortliche Substanzen für die metabolische Amplifikation zu identifizieren. Dabei wurden u.a. Glutamat, α -Ketoisocapronat, NADPH oder α -Ketoglutarat als mögliche Kandidaten in Betracht gezogen (Ivarsson et al. 2005; Maechler und Wollheim 1999; Panten und Rustenbeck 2008; Rabaglia et al. 2005). Jüngste Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass durch Metabolismus der Nährstoffstimuli vermehrt Acetyl-CoA gebildet und aus den Mitochondrien heraus geschleust wird. Die amplifizierende Wirkung soll schließlich über Acetylierung cytosolischer Proteine vermittelt werden (Panten et al. 2016).

Sowohl bei der Aufdeckung der metabolischen Amplifikation und bei der Suche nach deren Botenstoffen als auch bei anderen Untersuchungen zur Physiologie der β -Zelle, kamen und kommen immer wieder pharmakologische Werkzeuge wie die oben genannte Kaliumdepolarisation und Diazoxid zum Einsatz. Auch wenn die meisten der Erkenntnisse, die auf dem Einsatz solcher Substanzen beruhen, dank weiterer Methoden zweifelsfrei belegt sind, so gibt es bei einigen davon aufgrund ihrer mangelnden Spezifität doch Zweifel an deren Eignung bei der Erforschung feinerer Mechanismen. Die nachfolgend beschriebenen pharmakologischen Werkzeuge wurden im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Effekte auf elementare Strukturen und Prozesse der β -Zellen überprüft.

1.4 Pharmakologische Werkzeuge in der Insulinsekretionsforschung

1.4.1 Die Kaliumdepolarisation

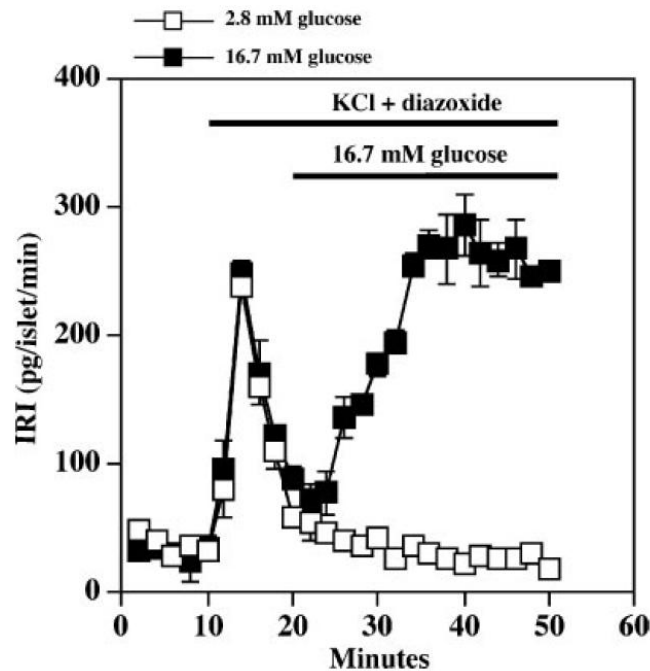


Abbildung 1.6: Darstellung der glucoseabhängigen metabolischen Amplifikation unter Einsatz von Kaliumdepolarisation und Diazoxid Die Kombination von 40 mM KCl und 250 μ M Diazoxid löst einen typischen erstphasigen Peak der Insulinsekretion aus, welche anschließend auf ein basales Niveau zurückfällt (offene Kästchen). In Anwesenheit einer stimulatorischen Glucosekonzentration (16,7 mM) schließt sich jedoch ein erneuter Anstieg der Sekretionsrate an, die zweite Phase der Insulinsekretion (geschlossene Kästchen). Diazoxid hält die K_{ATP} -Kanäle geöffnet, weshalb die insulinotrope Wirkung der Glucose nicht über eine weitere Depolarisation der β -Zellmembran vermittelt werden kann; ein Nachweis für die metabolische Amplifikation (aus Straub und Sharp 2004).

Wie im vorangegangenen Kapitel genannt, setzten Gembal und Kollegen Kaliumchlorid in erhöhter Konzentration ein, um eine unkomplizierte und möglichst nebenwirkungsfreie Depolarisation der β -Zellen herbeizuführen. Dabei wurde die Konzentration im Medium von der physiologischen, extrazellulären Konzentration von 4,8 mM auf 30 mM erhöht. Nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung führt dies zu einer Depolarisation um etwa 35 mV (Goldman 1943), in Folge derer nach Calciumeinstrom die erste Phase der Insulinsekretion ausgelöst wird. In Kombination mit dem K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid konnte so die K_{ATP} -Kanal-unabhängige Wirkung der Glucose auf die Insulinsekretion beobachtet werden. Straub und Sharp (2002, 2004) griffen diese Methode für weitere Untersuchungen zur metabolischen Amplifikation auf (Abb. 1.6, hier 40 mM KCl).

Doch auch in anderen Bereichen der β -Zell-Forschung wird gerne auf die einfache und stabile Methode der Kaliumdepolarisation zurückgegriffen. So untersuchten Pizarro-Delgado et al. (2014, 2015) einen möglichen Einfluss der Connexin-Hemichannels auf die β -Zellfunktion, indem sie diese – u.a. spannungsgesteuerten – Kanäle zunächst mithilfe der Kaliumdepolarisation aktivierten. Da dafür eine sehr starke Depolarisation notwendig ist, kam eine Kaliumkonzentration von 70 mM zum Einsatz, welche im Vergleich zu 40 mM jedoch eine nur noch verhältnismäßig geringe Depolarisation um weitere ca. 15 mV bewirkt.

Willenborg et al. (2012) fiel jedoch auf, dass erhöhte Kaliumkonzentrationen nicht nur eine sekretionsstimulierende, sondern zudem eine verzögert einsetzende sekretionshemmende Wirkung auf einen sich anschließenden Glucosestimulus haben. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt konzentrations- sowie calciumabhängig ist.

In der Veröffentlichung von Belz et al. (2014) wurde die Kaliumdepolarisation und ihr Einfluss auf Vorgänge in der β -Zelle eingehender untersucht. Bemerkenswerterweise führte eine moderate Erhöhung der Kaliumkonzentration auf 15 mM bei gleicher Depolarisationsstärke und äquivalentem Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration wie bei einer stimulatorischen Glucosekonzentration (20 mM) dennoch nicht zu einem Anstieg der Insulinsekretion. Die deutlich stärker depolarisierende Kaliumkonzentration von 40 mM steigerte die cytosolische Calciumkonzentration im Vergleich zu 15 mM KCl zwar nur noch in geringem Maße, führte dafür aber zu einem markanten Anstieg der Sekretion. Zudem wurde eine Veränderung des calciumgetragenen Aktionsstrommusters beobachtet (Abb. 1.7, links). 15 mM Kalium bewirkte eine Verlängerung bzw. Verschmelzung der durch Tolbutamid und TEA sichtbar gemachten Aktionsströme, 40 mM Kalium den Übergang in einen kontinuierlichen Calciumeinwärtsstrom. Dies resultierte in einem erneuten, erstphasenartigen Anstieg der Sekretion, nachdem durch das Tolbutamid bereits eine erste Phase der Insulinsekretion hervorgerufen worden war (Abb. 1.7, rechts). Die Ergebnisse legen nahe, dass die stark insulinotrope Wirkung hoher Kaliumkonzentrationen nicht allein über Membrandepolarisation vermittelt werden kann. Eine stärkere Depolarisation bis zu einem Wert von etwa 0 mV erhöht zwar die Öffnungswahrscheinlichkeit der spannungsgesteuerten Calciumkanäle, was bedeutet, dass mehr Kanäle gleichzeitig öffnen. Eine Veränderung der Öffnungscharakteristik, also eine Verlängerung der Öffnungszeit bis hin zur kontinuierlichen Aktivität wird dadurch jedoch nicht herbeigeführt (Braun et al. 2008; Rorsman und Trube 1986). Da sämtliche Effekte durch den unspezifischen Calciumkanalblocker Cobaltchlorid gehemmt wurden, der L-Typ-spezifische Blocker Nifedipin aber teilweise unwirksam

war, wurde ein Einfluss auf L-Typ Calciumkanäle als ein möglicher weiterer Mechanismus diskutiert, kann aber nicht allein verantwortlich sein. Es wurde ein theoretischer Vergleich mit dem direkten L-Typ Calciumkanalöffner (\pm)-Bay K8644 angestellt.

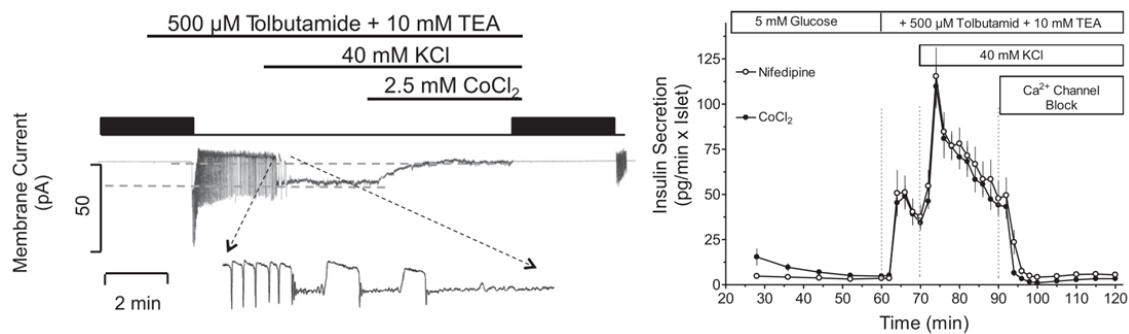


Abbildung 1.7: Calcium-vermittelter Effekt von 40 mM Kaliumchlorid auf die Insulinsekretion

Links: Membranstrommessung einzelner β -Zellen im *Voltage Clamp*-Modus der Patch-Clamp-Technik. In Anwesenheit von 500 μ M Tolbutamid und 10 mM TEA, die durch Hemmung kompensatorischer Kaliumströme Calciumaktionsströme sichtbar machen, verwandelt 40 mM KCl die Aktionsströme in einen kontinuierlichen Calciumeinwärtsstrom. Dieser wurde durch den Calciumkanalblocker Cobaltchlorid vollständig gehemmt. **Rechts:** Perifusionsmessung intakter Langerhans'scher Inseln zur Bestimmung der Insulinsekretionsrate. Unter denselben Bedingungen führte 40 mM KCl einen erneuten, erstphasenartigen Anstieg der bereits durch Tolbutamid induzierten Insulinsekretion herbei. Sowohl Nifedipin als auch CoCl_2 senkten diese auf prästimulatorische Werte (aus Belz et al. 2014).

1.4.2 Mefloquin

Einen neuen Ansatzpunkt für ein mögliches weiteres Target der Kaliumdepolarisation stellen die in Kap.1.2.2 angesprochenen Connexin-Hemichannels dar, deren Aktivierung zu einem zusätzlichen Calciumeinstrom und so zu einer verstärkten Insulinsekretion führen könnte. Dies zu untersuchen erfordert spezifische Mittel, die keine weiteren Effekte auf elementare Vorgänge der β -Zelle haben.

Cruikshank et al. (2004) fanden auf der Suche nach einem pharmakologischen Mittel zur gezielten, experimentellen Hemmung bestimmter *gap junctions* heraus, dass Mefloquin spezifisch die *gap junctions* der Connexin-Subtypen Cx36 und Cx50 hemmt. Da andere *gap junctions* erst bei 10- bis 100-fach höheren Konzentrationen gehemmt wurden, wurde es als geeignetes Mittel zur Untersuchung der genannten Subtypen empfohlen; auch in pankreatischen β -Zellen, weshalb es hier ebenfalls zum Einsatz kommt, so z.B. bei Pizarro-Delgado et al. (2014).

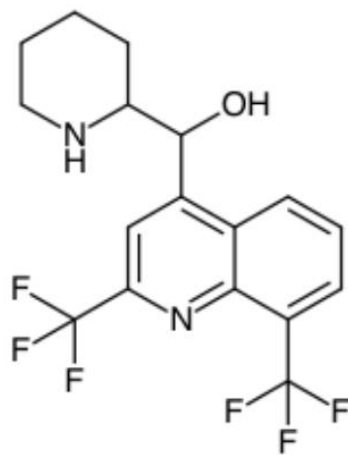


Abbildung 1.8: Strukturformel von Mefloquin

Mefloquin (Abb. 1.8) ist ein Derivat der Chinarindenalkaloide Chinin und Chinidin und wird sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe der Malaria eingesetzt, welche durch die Plasmodien *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* und *P. ovale* hervorgerufen wird. Es wirkt schizontozid, d.h. es tötet die intraerythrozytären Blutschizonten dieser Parasiten ab, indem es in den Stoffwechsel dieser ungeschlechtlichen Zwischenstufe eingreift. Der Wirkmechanismus ist noch nicht endgültig aufgeklärt, es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Mefloquin einen Komplex mit Ferriprotoporphyrin IX (FPPIX), einem für die Schizonten giftigen Abbauprodukt des Hämoglobins, bildet und so den Entgiftungsprozess, nämlich die Aggregation zu Hämozoin inhibiert (Gildenhuys et al. 2015).

Nachdem es lange Zeit vor allem zur Prophylaxe bei Reisen und Einsätzen in den Tropen empfohlen und extensiv genutzt wurde, hat es in den letzten Jahren stark an Bedeutung verloren, da immer mehr Nebenwirkungen bekannt wurden. Dazu gehören u.a. teilweise lang anhaltende Sehstörungen sowie dramatische psychische Symptome, die letztendlich zu einer drastischen Indikationseinschränkung geführt haben. Die Hemmung der Connexin-Subtypen Cx36 in Neuronen und Cx50 in der Augenlinse wäre eine mögliche Erklärung für das Auftreten dieser unerwünschten Wirkungen

Es liegen allerdings bereits Erkenntnisse vor, die an der zuvor angenommenen Spezifität des Mefloquins für die Connexine Cx36 und Cx50 und damit an seiner Eignung für den Einsatz in unseren Untersuchungen zur eventuellen Beteiligung von Hemichannels an der insulinotropen Wirkung der Kaliumdepolarisation zweifeln lassen. Nachdem es Hinweise auf Hypoglykämien unter der Therapie mit Mefloquin und

verwandten Malariamitteln gegeben hatte, konnte nachgewiesen werden, dass diese Substanzen durch Blockade der K_{ATP} -Kanäle eine Insulinsekretion induzierten. Anders als bei den Sulfonylharnstoffen, wurde dieser Effekt aber nicht durch Bindung an der SUR1-Untereinheit, sondern durch direkten Angriff an der $K_{ir6.2}$ -Untereinheit vermittelt (Gribble et al. 2000). Da $K_{ir6.2}$ Bestandteil von K_{ATP} -Kanälen verschiedener Gewebe bzw. Organe (u.a. Herz und Neuronen) ist, wurde auch dieser Effekt vom Mefloquin als möglicherweise mitverantwortlich für dessen Nebenwirkungen vorgeschlagen (Ashcroft and Gribble 1998).

1.4.3 Diazoxid

Für selektive Untersuchungen der metabolischen Amplifikation ist die Kaliumdepolarisation allein noch nicht ausreichend. Ein zweiter Wirkstoff ist nötig um zu verhindern, dass die zu untersuchenden Nährstoffstimuli ihre Wirkung über den Verschluss der K_{ATP} -Kanäle und weitere Membrandepolarisation entfalten.

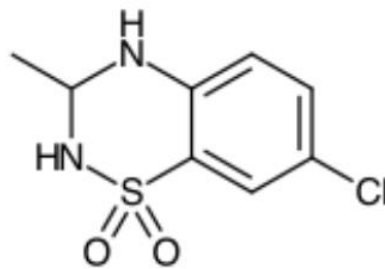


Abbildung 1.9: Strukturformel von Diazoxid

Hier hat sich das Benzothiadiazin-Derivat Diazoxid (Abb. 1.9) als das Mittel der Wahl etabliert, nicht zuletzt weil ihm eine hohe Selektivität zugesprochen und eine Beeinflussung des β -Zell-Stoffwechsels ausgeschlossen wurde. Diazoxid hemmt als direkter K_{ATP} -Kanalöffner effektiv die durch Glucose und andere Nährstoffe induzierte, nicht aber die Kalium-induzierte Insulinsekretion und ist daher für diesen Einsatz scheinbar bestens geeignet (Ashcroft, Hedekov, und Randle 1970; Gembal et al. 1992; Henquin et al. 1982; Trube, Rorsman, und Ohno-Shosaku 1986).

Grimmsmann und Rustenbeck (1998) zeigten allerdings, dass Diazoxid in Konzentrationen, die für eine maximale K_{ATP} -Kanalaktivierung nötig sind (Züñkler et al. 1988), direkt mit dem mitochondrialen Energiestoffwechsel interagiert.

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die metabolische Amplifikation ist zwar als wichtiger Prozess im Rahmen der Nährstoff-induzierten Insulinsekretion allgemein anerkannt, jedoch sind die genauen Mechanismen, die ihr zugrunde liegen, noch immer nicht endgültig aufgeklärt.

Das experimentelle Protokoll zur Darstellung der metabolischen Amplifikation existiert in zwei Varianten: 1. Sulfonylharnstoff in maximal effektiver Konzentration für vollständige K_{ATP} -Kanalblockade, 2. Kaliumdepolarisation in Kombination mit dem K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid. In beiden Fällen kann ein anschließender Nährstoffstimulus keine weitere Depolarisation mehr bewirken und die Insulinsekretion nur noch über amplifizierende Signalwege verstärken.

Das letztere Protokoll hat allerdings gleich zwei Schwachstellen: Zum einen unterscheidet sich die Kaliumdepolarisation von der Depolarisation durch K_{ATP} -Kanalblockade hinsichtlich des Depolarisationsmusters. Zum anderen hat Diazoxid als Öffner von K_{ATP} -Kanälen eine nur mäßige Spezifität.

In vorangegangenen Arbeiten hat sich gezeigt, dass eine Kaliumdepolarisation von 40 mM nicht aber von 15 mM das Muster der Calciumeinwärtsströme von scharf getrennten Aktionsströmen in einen kontinuierlichen Einwärtsstrom wandelt. Somit bewirkt sie eine Exozytosestimulation von unphysiologischer Stärke.

Daraus ergibt sich folgende Fragestellung:

1. Wird dieser Effekt hoher Kaliumkonzentrationen durch eine direkte Beeinflussung spannungsabhängiger Calciumkanäle bewirkt?
2. Gibt es andere Zielstrukturen als spannungsabhängige Calciumkanäle, die diesen Effekt der Kaliumdepolarisation vermitteln?
3. Lässt sich der mögliche Beitrag zusätzlicher Calciumeinstromwege pharmakologisch spezifisch hemmen?
4. Lässt sich eine Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials durch Diazoxid bestätigen?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien

| Bezeichnung | Hersteller/Lieferant |
|---|---|
| (±)-Bay K8644 | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure (HEPES, Pufferan®) | Carl Roth (Karlsruhe, D) |
| Adenosintriphosphat Dinatriumsalz (Na ₂ ATP x 3H ₂ O) | Roche Diagnostics (Mannheim, D) |
| Bovines Serum Albumin (BSA, Albumin Fraktion V) | Merck (Darmstadt, D) |
| Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ x 2H ₂ O, ≥99 %) | Carl Roth (Karlsruhe, D) |
| Cesiumchlorid (CsCl, ≥99 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Cobaltchlorid-Hexahydrat (CoCl ₂ x 6H ₂ O, ≥98 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Collagenase NB8 Broad Range | Serva Electrophoresis (Heidelberg, D) |
| D600 (±Methoxyverapamil-Hydrochlorid, Gallopamil) | Knoll (Ludwigshafen, D) |
| D-Glucose-Monohydrat (reinst, Ph. Eur.) | AppliChem (Darmstadt, D) |
| Diazoxid | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Diethylether (Rotipuran®, ≥99,5 %, p. a.) | Carl Roth (Karlsruhe, D) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO, for molecular biology) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Essigsäure 96 % | Merck (Darmstadt, D) |
| Ethanol, entwässert, vergällt mit 1 % Petrolether | Berkel AHK (Ludwigshafen, D) |
| Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Fetales Kälberserum (FCS, heat inactivated, Origin: South America) | Gibco/ Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Fluo-4 (AM) | Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Fura-2 LeakRes (AM) | TEFLabs (Austin, TX, USA) |
| Kaliumchlorid (KCl, ≥99 %, Ph. Eur.) | Carl Roth (Karlsruhe, D) |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Merck (Darmstadt, D) |

| Bezeichnung | Hersteller/Lieferant |
|--|---|
| Kaliumhydroxid (KOH, Plätzchen, ≥85 %, p. a.) | Carl Roth (Karlsruhe, D) |
| Kaliumsulfat (K_2SO_4 , ≥99 %) | Carl Roth (Karlsruhe, D) |
| Kollagen (Type I, from calf skin) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2 \times 6H_2O$) | Merck (Darmstadt, D) |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4 \times 7H_2O$, ≥99 %, p. a.) | Carl Roth (Karlsruhe, D) |
| Mefloquin-Hydrochlorid (≥98 %, HPLC) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Natriumazid (NaN_3) | Acros Organics (Geel, BEL) |
| Natriumchlorid ($NaCl$, ≥99,5 %, p. a.) | Carl Roth (Karlsruhe, D) |
| Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$, for cell culture) | AppliChem (Darmstadt, D) |
| Natriumhydroxid ($NaOH$, Plätzchen, p. a.) | Merck (Darmstadt, D) |
| Nifedipin (≥98 %, HPLC) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Nisoldipin (≥98 %, HPLC) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Nystatin | Carl Roth (Karlsruhe, D) |
| Pen./Strep. (10.000 Units/ml Penicillin +10.000 µg/ml Streptomycin) | Gibco/ Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) |
| Phosphoenolpyruvat Monokaliumsalz (PEP-K, ≥97 %, enzymatic) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Pyruvatkinase (from rabbit muscle) | Roche Diagnostics (Mannheim, D) |
| Rhodamin123 | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| RPMI1640-Medium, Pulver (+ L-Glutamin, w/o Glucose, w/o- $NaHCO_3$) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Salzsäure 37% (HCl) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Tetraethylammoniumchlorid (TEA-Cl, ≥99 %) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Tolbutamid (analytical standard) | Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Trichloressigsäure (TCA, p.a.) | Merck (Darmstadt, D) |

3.2 Verbrauchsmaterialien und allgemeine Geräte

Wenn nicht anders erläutert, wurden Einweglabormaterialien wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Zentrifugenröhrchen, Spritzenfilter oder sterile Zellkulturschalen von Sarstedt (Nümbrecht, D) bezogen.

Zum Erwärmen von Lösungen und Medien auf 37 °C und für den Collagenaseverdau bei 37 °C wurde ein Inkubationsbad (Typ 1003, Gesellschaft für Laborbedarf, Burgwedel, D) genutzt. Außerdem kamen regelmäßig eine Zentrifuge (Biofuge primo R, Heraeus, Hanau, D), ein pH-Meter (Labor-pH-Meter 765, Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin, D), ein Magnetrührer (RCT basic, IKA-Werke GmbH, Staufen, D) sowie Vortexmischer (MS3 basic und MS1 minishaker, IKA-Werke GmbH, Staufen, D) zum Einsatz.

Sterile Arbeiten wurden unter einer Cleanbench (Herasafe HS12, Heraeus, Hanau, D), semisterile Pickarbeiten zur Inselisolierung in einer PCR Werkbank (UV3 HEPA PCR Workstation, UVP, LLC, Upland, CA, USA) durchgeführt. Vor Verwendung unter den Werkbänken wurden sämtliche Geräte und Materialien äußerlich mit Ethanol 70 % desinfiziert.

Die Kultivierung der murinen Primärzellen erfolgte bei 37 °C und einer Mischung aus 95 % Luft und 5 % CO₂ in einem CO₂-Inkubator (MCO-18AIC (UV), Sanyo, Moriguchi, JPN).

Reinstwasser zum Ansetzen sämtlicher Lösungen und Medien wurde einer Wasseraufbereitungsanlage (Purelab flex 2, Elga LabWater, Celle, D) entnommen.

3.3 Stammlösungen

3.3.1 Stammlösungen zur Herstellung der frischen, nicht sterilen Krebs-Ringer-Lösung

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Stammlösungen bis zu 2 Wochen bei 2–8 °C gelagert und nach Erwärmen auf Raumtemperatur verwendet.

Lösung 1: 0,9 % NaCl MG 58,44 g/mol

18,00 g wurden in 2 l Reinstwasser gelöst.

Lösung 2: 1,15 % KCl MG 74,55 g/mol

5,75 g wurden in 500 ml Reinstwasser gelöst.

Lösung 3: 1,62 % $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ MG 147,02 g/mol

8,10 g wurden in 500 ml Reinstwasser gelöst.

Lösung 4: 2,11 % KH_2PO_4 MG 136,09 g/mol

5,275 g wurden in 250 ml Reinstwasser gelöst.

Lösung 5: 3,82 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ MG 246,48 g/mol

9,55 g wurden in 250 ml Reinstwasser gelöst.

Lösung 6: 1,30 % NaHCO_3 MG 84,01 g/mol

13,0 g wurden in 1 l Reinstwasser gelöst.

Lösung 7: 7,74 % HEPES + 6,5 % Albumin + 154 mM NaOH

32,5 g BSA wurden in 200 ml Reinstwasser gelöst. Außerdem wurden 38,7 g HEPES in ca. 125 ml Reinstwasser gelöst, 77,0 ml 1 N NaOH dazugegeben (pH 7,4), die Lösungen vereinigt und mit Reinstwasser auf 500 ml aufgefüllt.

Lagerung bei -20 °C in Aliquots á 20 ml für bis zu 4 Monate.

3.3.2 Testsubstanzen

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Stammlösungen bei 2–8 °C gelagert.

Bay K8644, 10 mM MG 356,3 g/mol
3,563 mg wurden in 1 ml DMSO gelöst.
Verdünnung für Versuch: 1:10.000 (1 µM)

D600, 5 mM MG 521,09 g/mol
2,605 mg wurden in 1 ml Reinstwasser gelöst.
Verdünnung für Versuch: 1:100 (50 µM)

Diazoxid, 250 mM MG 230,7 g/mol
57,65 mg wurden in 1 ml DMSO gelöst.
Verdünnung für Versuch: 1:1000 (250 µM)

Mefloquin, 100 mM MG 414,77 g/mol
41,77 mg wurden in 1 ml DMSO unter Erwärmen (37 °C) gelöst.
Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur
Verdünnung für Versuch: 1:2000 – 1:20.000 (5–50 µM)

Natriumazid, 1 M MG 65,01 g/mol
65,01 mg wurden in 1 ml Reinstwasser gelöst.
Lagerung bei -20 °C in Aliquots á 200 µl
Verdünnung für Versuch: 1:200 (5 mM)

Nifedipin, 10 mM MG 346,3 g/mol
3,463 mg wurden in 1 ml DMSO gelöst.
Verdünnung für Versuch: 1:1000 (10 µM)

Nisoldipin, 10 mM MG 388,41 g/mol
3,884 mg wurden in 1 ml Ethanol absolut gelöst.
Verdünnung für Versuch: 1:10.000 (1 µM)

TEA, 1 M MG 165,7 g/mol
165,7 mg wurden in 1 ml Reinstwasser gelöst.
Verdünnung für Versuch: 1:100 (10 mM)

Tolbutamid, 50 mM MG 270,3 g/mol
13,52 mg wurden in 1 ml 0,1 N NaOH gelöst.
Verdünnung für Versuch: 1:100 (500 µM)

3.3.3 Fluoreszenzindikatoren

Fura-2 LeakRes (AM), 795 μM MG 1258,1 g/mol

Die fertigen Aliquots á 50 μg wurden in 50 μl DMSO gelöst.

Lagerung lichtgeschützt bei 2–8 °C auf Orangegelee

Für die Beladung wurde die Stammlösung 1:500 mit KR gemischt (1,6 μM).

Fluo-4 (AM), 1 mM MG 1096,95 g/mol

Die fertigen Aliquots á 50 μg wurden in 45,6 μl DMSO gelöst.

Lagerung lichtgeschützt bei 2–8 °C

Für die Beladung wurde die Stammlösung 1:1000 mit EZ gemischt (1 μM).

Rhodamin123 MG 380,83 g/mol

1 mg wurde in 1 ml DMSO gelöst und zu je 100 μl in 2 ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert, anschließend wurde in einer Zentrifuge mit angeschlossener Drehschieber-Vakuumpumpe (RD4, Vacuubrand, Wertheim, D) zur Trockne eingedampft.

Lagerung bei -20 °C

Vorbereitung für Versuch: 100 μg wurden in 1500 μl KR gelöst, für die Beladung wurden 300 μl mit 1700 μl RPMI-Medium gemischt (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

3.3.4 Nystatin-Stammlösung für die perforated patch-Konfiguration

Nystatin, 5 mg/ml MG 926,1 g/mol

2 mg wurden in 400 μl DMSO gelöst.

Die Lösung wurde während der Versuche lichtgeschützt auf Eis bzw. über Nacht bei 2–8 °C gelagert und bis zu 2 Tage benutzt.

Für den Gebrauch wurden am 1. Tag 40, am 2. Tag 50 μl mit Pipettenlösung zu 2 ml gemischt (0,1–0,125 mg/ml).

3.4 Lösungen und Medien

3.4.1 Krebs-Ringer-Lösung (KR)

Modifizierter Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer mit nichtflüchtigem HEPES-Puffer

a) Für 2 Liter sterile Krebs-Ringer-Lösung wurden

| | | |
|-----------|---------------------------------------|-----------|
| 13,441 g | NaCl | (115 mM) |
| 700,77 mg | KCl | (4,7 mM) |
| 752,74 mg | CaCl ₂ x 2H ₂ O | (2,56 mM) |
| 591,55 mg | MgSO ₄ x 7H ₂ O | (1,2 mM) |
| 3,360 g | NaHCO ₃ | (20 mM) |
| 326,61 mg | K ₂ HPO ₄ | (1,2 mM) |
| 4,766 g | HEPES | (10 mM) |
| 1,982 g | D-Glucose x H ₂ O | (5 mM) |

eingewogen und in einem Becherglas in ca. 1800 ml Reinstwasser gelöst.

Anschließend wurden

| | | |
|--------|-----|--------------|
| 2,00 g | BSA | (0,1 %, m/V) |
|--------|-----|--------------|

aufgestreut und ebenfalls gelöst.

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf etwa 7,2 eingestellt und der Ansatz in einem Messkolben mit Reinstwasser auf 2 l aufgefüllt. Die Lösung wurde steril filtriert und in Portionen á 80 ml bei 4 °C gelagert.

Vor Gebrauch wurde der pH-Wert überprüft und mit 1 N HCl auf 7,4 eingestellt.

b) Zur Herstellung von 78 ml frischer, unsteriler Krebs-Ringer-Lösung (Stammlösungen aus Kap. 3.3.1) wurden

| | | |
|---------|---|------------|
| 60 ml | Lösung 1 (NaCl) | (118,5 mM) |
| 2,4 ml | Lösung 2 (KCl) | (4,7 mM) |
| 1,8 ml | Lösung 3 (CaCl ₂) | (2,5 mM) |
| 0,6 ml | Lösung 4 (K ₂ HPO ₄) | (1,2 mM) |
| 0,6 ml | Lösung 5 (MgSO ₄) | (1,2 mM) |
| 10,2 ml | Lösung 6 (NaHCO ₃) | (20,1 mM) |

in genau dieser Reihenfolge zusammengeführt und bei 37 °C für 30 min mit Carbogen begast.

Im Anschluss wurden

| | | |
|----------|----------------------------|---------|
| 2,4 ml | Lösung 7 (HEPES-Albumin) | (10 mM) |
| 77,22 mg | Glucose x H ₂ O | (5 mM) |

hinzugefügt und unter Schwenken vermischt.

3.4.2 Calciumfreie Lösung (modifiziert nach Lernmark 1974)

Für 100 ml Lösung wurden

| | | |
|----------|---------------------------------------|----------|
| 789,9 mg | NaCl | (135 mM) |
| 35,8 mg | KCl | (4,8 mM) |
| 16,3 mg | K ₂ HPO ₄ | (1,2 mM) |
| 29,6 mg | MgSO ₄ x 7H ₂ O | (1,2 mM) |
| 19,0 mg | EGTA | (0,5 mM) |
| 595,8 mg | HEPES | (25 mM) |
| 59,4 mg | Glucose x H ₂ O | (3 mM) |

in ein Becherglas eingewogen und in 80 ml Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 2 N NaOH auf 7,4 eingestellt, anschließend wurde

| | | |
|--------|-----|------------|
| 1,00 g | BSA | (1 %, m/V) |
|--------|-----|------------|

aufgestreut und ebenfalls gelöst. Der Ansatz wurde in einem Messkolben mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt, steril filtriert und in Portionen á 5 ml bei 2–8 °C gelagert.

3.4.3 Kollagen-Lösung für Inseln in Zellkultur

| | |
|------|----------|
| 1 mg | Kollagen |
|------|----------|

wurde in 2 ml steril filtrierter 0,2 %-iger Essigsäure im Schüttelbad bei 37 °C gelöst. Die Lösung wurde bei 2–8 °C gelagert.

3.4.4 RPMI 1640-Medium

Für 1 Liter Medium mit 5 bzw. 10 mM Glucose wurden

| | | |
|--------------|----------------------------|--------------|
| 8,4 g | RPMI-Mediumpulver | |
| 2,0 g | NaHCO ₃ | (24 mM) |
| 0,991 g | Glucose x H ₂ O | (5 mM) |
| bzw. 1,982 g | | bzw. (10 mM) |

in 800 ml Reinstwasser gelöst und

| | | |
|-------|-------------|-------------------------|
| 10 ml | Pen./Strep. | (100 IU/ml / 100 µg/ml) |
|-------|-------------|-------------------------|

hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf pH 7,2 eingestellt und mit Reinstwasser auf 900 ml aufgefüllt. Nach Sterilfiltration wurde das Medium in Portionen á 45 oder 90 ml bei 2–8 °C gelagert.

Vor der Verwendung wurde dem Medium 10 % FCS beigemischt und das angebrochene Aliquot innerhalb von 2 Wochen aufgebraucht.

3.4.5 Extrazelluläre Lösung für Patch-Clamp-Versuche (EZ)

a) Zur Herstellung von 2 l EZ für Messungen des Membranpotentials wurden

| | | |
|-----------|---------------------------------------|----------|
| 16,363 g | NaCl | (140 mM) |
| 834,96 mg | KCl | (5,6 mM) |
| 487,92 mg | MgCl ₂ x 6H ₂ O | (1,2 mM) |
| 764,50 mg | CaCl ₂ x 2H ₂ O | (2,6 mM) |
| 4,766 g | HEPES | (10 mM) |
| 1,982 g | Glucose x H ₂ O | (5 mM) |

in 1800 ml Reinstwasser gelöst. Der Ansatz wurde mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt und mit Reinstwasser auf 2 l aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 2–8 °C gelagert und bis zu 2 Wochen verwendet.

Diese Lösung wurde auch für *Voltage Clamp*-Messungen sowie für mikrofluorimetrische Messungen am EPC7-Set-up verwendet.

b) Zur Herstellung von 1 l EZ für Ca^{2+} -Kanalmessungen wurden

| | | |
|-----------|--|----------|
| 6,896 g | NaCl | (118 mM) |
| 417,48 mg | KCl | (5,6 mM) |
| 243,96 mg | $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | (1,2 mM) |
| 382,25 mg | $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | (2,6 mM) |
| 1,192 g | HEPES | (5 mM) |
| 3,314 g | TEA-Cl | (20 mM) |
| 990,85 mg | Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$ | (5 mM) |

in 800 ml Reinstwasser gelöst. Der Ansatz wurde mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 2–8 °C gelagert und bis zu 2 Wochen verwendet.

3.4.6 Pipettenlösungen für Patch-Clamp-Versuche

a) Für 100 ml Pipettenlösung für die *perforated patch*-Konfiguration (Smith, Ashcroft, and Rorsman 1990) wurden

| | | |
|-----------|--|---------|
| 58,44 mg | NaCl | (10 mM) |
| 74,55 mg | KCl | (10 mM) |
| 142,31 mg | $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | (7 mM) |
| 1,22 g | K_2SO_4 | (70 mM) |
| 119,16 mg | HEPES | (5 mM) |

in 80 ml Reinstwasser gelöst. Der Ansatz wurde mit 1 N KOH auf pH 7,35 eingestellt und mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 2–8 °C gelagert.

Vor Gebrauch wurden 40 μl (1. Tag) bzw. 50 μl (2. Tag) einer alle zwei Tage frisch hergestellten Nystatin-Stammlösung (5 mg/ml, Kap. 3.3.4) mit der Pipettenlösung zu 2 ml gemischt.

b) Zur Herstellung von 100 ml Pipettenlösung für kontinuierliche Membranstrommessungen in der *whole cell*-Konfiguration wurden

| | | |
|-----------|---------------------------------------|----------|
| 1,044 g | KCl | (140 mM) |
| 20,33 mg | MgCl ₂ x 6H ₂ O | (1 mM) |
| 119,16 mg | HEPES | (5 mM) |
| 380,40 mg | EGTA | (10 mM) |
| 29,40 mg | CaCl ₂ x 2H ₂ O | (2 mM) |

in 80 ml Reinstwasser gelöst. Der Ansatz wurde mit 1 N KOH auf pH 7,15 eingestellt und mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 2–8 °C gelagert.

c) Für 50 ml Pipettenlösung für Ca²⁺-Kanalmessungen in der *whole cell*-Konfiguration (modifiziert nach Vignali et al. 2006) wurden

| | | |
|-----------|---|----------|
| 521,85 mg | KCl | (140 mM) |
| 10,17 mg | MgCl ₂ x 6H ₂ O | (1 mM) |
| 119,16 mg | HEPES | (10 mM) |
| 190,18 mg | EGTA | (10 mM) |
| 90,78 mg | Na ₂ ATP x 3H ₂ O | (3 mM) |

in 30 ml Reinstwasser gelöst. Der Ansatz wurde mit 1 N KOH auf pH 7,15 eingestellt und mit Reinstwasser auf 50 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 2–8 °C gelagert.

3.4.7 Neutralisierpuffer für ATP-Bestimmung (nach Detimary, Jonas und Henquin 1995)

| | | |
|---------|---------------------------------------|---------|
| 238 mg | HEPES | (20 mM) |
| 30,5 mg | MgCl ₂ x 6H ₂ O | (3 mM) |

wurden in 45 ml Reinstwasser gelöst. Der Ansatz wurde mit 1 N KOH auf pH 7,75 eingestellt und mit Reinstwasser auf 50 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 2–8 °C gelagert.

3.5 Präparation und Kultivierung intakter Inseln und einzelner β -Zellen

3.5.1 Versuchstiere

Es wurden Inseln von weiblichen, 12–14 Wochen alten NMRI-Mäusen gewonnen, die in der universitätseigenen Tierhaltung (ZET) gezüchtet wurden. Die Mäuse wurden in einem Raum bei konstanter Temperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 16-fachem Luftwechsel pro Stunde und einem 12h-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Futter (1328P, Haltungsdiät für Ratten und Mäuse, phytoöstrogenarm, Hybridpellets, Altromin, Lage, D) und Wasser. Die Einstreu (LTE E-001, Labortiereinstreu aus Espenholz, staubfrei, Abedd, Wien, A) wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

3.5.2 Inselisolierung

Für die Isolierung der Langerhans'schen Inseln aus dem Pankreas von Mäusen wurde abhängig von der weiteren Verwendung nach zwei verschiedenen Verfahren vorgegangen.

a) Für Perifusionsmessungen frisch isolierter Inseln wurde die vereinfachte, sogenannte „Schnippelmethode“ genutzt. Dafür wurde nicht sterile Krebs-Ringer-Lösung (KR, Kap. 3.4.1b) frisch hergestellt. Es wurden ca. 3 mg Collagenase genau in ein Schraubdeckelgläschen eingewogen und in Abhängigkeit der Einwaage und der Aktivität der Collagenase ca. 3 ml KR in ein weiteres Schraubdeckelgläschen gefüllt. Das Zusammenführen dieser beiden Gläschen ergab eine Lösung mit einer Aktivität von 1,4 U/ml. Diese beiden Gläschen wurden bis zum späteren Gebrauch auf Eis gelagert. Außerdem wurden für den Transport des frisch entnommenen Pankreas etwa 3 ml KR in ein weiteres Gläschen gefüllt und dieses ebenfalls auf Eis gelagert.

Die Maus wurde durch einen schnellen Schnitt mit einer Schere enthauptet, der Bauchraum mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und eröffnet. Mit zwei Pinzetten wurde das Pankreas möglichst zügig, vollständig und frei von weiterem Gewebe entnommen und zum Transport in das gekühlte Gläschen mit KR überführt.

Noch festhängende Reste von Fettgewebe wurden gegebenenfalls entfernt und das Pankreas in das Gläschen mit dem definierten Volumen an KR überführt. Anschließend wurde es mit einer scharfen Schere innerhalb von 5 min möglichst gründlich zerkleinert und der erhaltene Gewebepulver in das Schraubdeckelgläschen mit der Collagenase überführt, um die Inseln vom umliegenden Pankreasgewebe zu trennen. Diese Mischung wurde 9 min 30 sek bei 37°C im Schüttelbad (Schüttelfrequenz 328 rpm)

inkubiert. Direkt nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Verdau durch Auffüllen mit eiskalter KR und kräftiges Schütteln gestoppt. Nach 5-minütigem Stehenlassen wurde der Überstand zu etwa zwei Dritteln abgesaugt, nochmals mit eiskalter KR aufgefüllt und kräftig geschüttelt. Die so erhaltene Suspension wurde in ein großes, von außen schwarz bemaltes Petrischälchen überführt. Die restliche KR wurde auf zwei weitere kleinere schwarze Petrischälchen aufgeteilt. Unter einem Stereomikroskop (Zeiss, Jena, D) mit Kaltlichtlampe (KL1500, Schott, Mainz, D) wurden die frei liegenden, aber noch nicht angedauten (glatte Oberfläche) Inseln mit einer 200 µl Eppendorfpipette herausgepickt und zur weiteren Reinigung in das nächst kleinere Schälchen gesetzt. Hingen noch Gewebereste an den Inseln, wurden diese mithilfe der geschliffenen Kanten von Kanülen abgetrennt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt bis die Inseln im kleinsten Schälchen möglichst rein vorlagen. Mit dieser Methode wurden gut 50 Inseln mit intakter Sekretionsleistung für einen Perifusionsversuch erhalten. Diese wurden in ein weiteres Schälchen mit einer nach unten spitz zulaufenden Ausfräsung gesetzt, aus dem sie alle auf einmal entnommen und in die Perifusionskammer gefüllt werden konnten (s. Kap. 3.8.2).

b) Sollten die Inseln im Ganzen oder nach Dissoziation der Inselzellen kultiviert werden oder der Gehalt der Adeninnucleotide bestimmt werden, wurde wegen der besseren Ausbeute das klassische, aber handwerklich etwas kompliziertere Verfahren des Collagenaseverdaus nach Injektion in den Gallengang angewendet (Gotoh et al. 1985). Dabei wird sich zu Nutze gemacht, dass Pankreasgang (Ductus pancreaticus) und Gallengang (Ductus choledochus) gemeinsam in den Zwölffingerdarm (Duodenum) einmünden. Auf die richtige Weise injiziert fließt die Collagenaselösung retrograd in den exokrinen Teil des Pankreas und verdaut diesen, während die strukturell isolierten, endokrinen Langerhans'schen Inseln weitestgehend unversehrt bleiben.

Dafür wurden ca. 3,5 mg Collagenase in kalter, steriler KR (Kap. 3.4.1a) zu einer Aktivität von 1,4 U/ml gelöst und in einer Einwegspritze (Injekt®, B. Braun, Melsungen, D) mit Kanüle (Sterican®, 0,30 x 1,2 mm, B. Braun, Melsungen, D) auf Eis gelagert.

Die durch Dekapitation getötete Maus wurde auf einer mit Alufolie umwickelten Korkplatte fixiert. Nach Desinfektion des Rumpfes mit 70 %-igem Ethanol wurde der Bauchraum eröffnet und der Gallengang im Bereich des Duodenums freigelegt. Mit einer Arterienklemme wurde die Einmündung in das Duodenum (Papilla duodeni Vateri) abgeklemmt, damit die Collagenaselösung nicht in den Dünndarm fließen kann, und der Gallengang auf Spannung gebracht. Die Kanüle der Spritze mit der Collagenaselösung wurde nun so in den Gallengang eingeführt, dass die Spitze in

Richtung des Pankreas zeigte. So konnte die Collagenaselösung über den an den Gallengang angeschlossenen Pankreasgang in das Pankreas gelangen, was durch ein deutliches Aufquellen zu erkennen war (Abb. 3.1). Danach wurde das Pankreas zügig und möglichst vollständig entnommen, in ein 10 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und auf Eis gelagert.

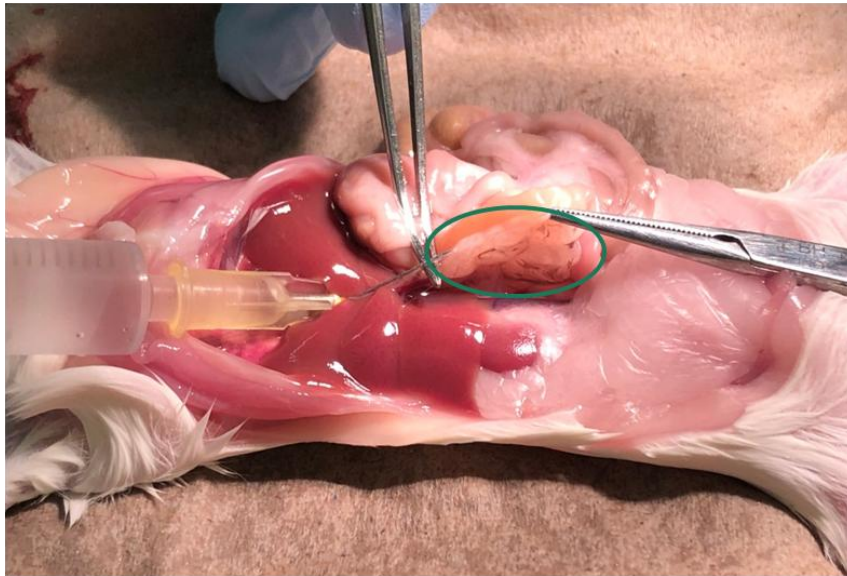


Abbildung 3.1: Collagenaseinjektion in den Gallengang Die Einmündungsstelle des Gallengangs in das Duodenum wird mit einer Arterienklemme abgeklemmt. Die Kanüle wird möglichst dicht an der Leber beginnend mit Orientierung in Richtung Pankreas und Duodenum in den Gallengang eingeführt und die collagenasehaltige Lösung eingespritzt. Durch das Anschwellen des vorher kompakten, weißen Pankreasgewebes ist die erfolgreiche Injektion erkennbar (markierter Bereich).

Das mit Collagenaselösung gefüllte Pankreas wurde für 9 min 45 sek im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, wovon es in den letzten 60 sek kräftig von Hand geschüttelt wurde. Anschließend wurde der Verdau sofort mit eiskalter KR gestoppt um eine Zerstörung der Inseln zu verhindern. Es wurde 15 sek bei 300 g zentrifugiert, der Überstand abgekippt, erneut mit eiskalter KR gewaschen, 15 sek zentrifugiert, abgekippt und ein letztes Mal mit KR aufgefüllt.

Die so erhaltene möglichst gewebefreie Inselsuspension wurde unter der Werkbank in ein großes, von außen schwarz bemaltes, sterilisiertes Petrischälchen überführt und die Inseln wie bei der „Schnippelmethode“ (a) gepickt. Hier wurde jedoch steril gearbeitet und es erfolgte ein zusätzlicher, dritter Reinigungsschritt. Auf diese Weise wurden je nach Präparat 150–250 Inseln aus einem Pankreas erhalten.

3.5.3 Kultivierung intakter Langerhans'scher Inseln

Sollten die so erhaltenen Inseln im Ganzen kultiviert werden, enthielt das kleinste Pickschälchen anstatt der Krebs-Ringer-Lösung RPMI-Medium (10 mM Glucose).

a) Für Sekretionsmessungen an kultivierten Inseln wurden Gruppen von etwa 80 Inseln entnommen und unter der Cleanbench in einem Tropfen in die Mitte steriler Zellkulturschälchen (35 x 10 mm, mit Nocken zur Belüftung) gesetzt. So wurde gewährleistet, dass auch nach Absterben einiger Inseln die für eine Messung nötigen 50 Inseln aus einem Schälchen gesammelt werden konnten. Anschließend wurden die Inseln mit 2,5 ml RPMI-Medium (5 mM Glucose, 37 °C) gefüttert, wobei die Inseln leicht aufgewirbelt wurden, um eine Adhäsion am Boden zu verhindern. Je drei solcher kleiner Schälchen wurden zusammen in eine große Zellkulturschale (10 mm, mit Nocken) gesetzt und 1–2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

b) Für Messungen der cytosolischen Calciumkonzentration mussten die Inseln während der Kultivierung auf Deckgläsern (Ø 25 mm, Stärke 0,16–0,19 mm, Borosilikatglas, Menzel) anwachsen. Dies wurde durch eine Beschichtung mit Kollagen begünstigt. Dafür wurde je ein Deckgläschen in ein Zellkulturschälchen (35 x 10 mm, mit Nocken) gelegt und 2 µl Kollagenlösung (3.4.3) in der Mitte des Deckgläschens dünn verteilt. Die vorbereiteten Schälchen wurden bis zur Verwendung unter der Cleanbench zum Trocknen stehen gelassen. Nach der Isolierung wurden dem letzten Pickschälchen mit RPMI-Medium je 2–3 Inseln entnommen und in einem kleinen Tropfen auf den Kollagenfilm gesetzt. Für ein erstes Absetzen wurden sie zunächst für 2,5–3 h in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde vorsichtig mit 2,5 ml RPMI-Medium (5 mM Glucose, 37 °C) gefüttert, ohne die Inseln wieder abzulösen. Nach 3 Tagen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ waren die Inseln fest genug angewachsen um vermessen zu werden.

3.5.4 Kultivierung einzelner β -Zellen

Inselzellen sind sowohl über *tight junctions* als auch *adherens junctions* miteinander verbunden, wodurch ein stabiler Zellverband aufrecht erhalten wird. Da diese beiden Typen der Zell-Zell-Verbindung calciumabhängig sind, können sie durch Inkubation in einer calciumfreien Krebs-Ringer-Lösung aufgebrochen und auf diese Weise die einzelnen Inselzellen gewonnen werden. (Lernmark 1974; Orci et al. 1975)

Nach der Inselisolierung wurden die freien und gut erhaltenen Inseln in einem Schälchen mit unten spitz zulaufender Ausfräsung gesammelt, der Überstand weitestgehend abgenommen und 100 μ l der calciumfreien Lösung (Kap. 3.4.2) mit Raumtemperatur draufgegeben. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Stoppuhr gestartet. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und nochmals 100 μ l Lösung draufgegeben. Dann wurden die Inseln in das Zentrifugenröhrchen mit der restlichen calciumfreien Lösung überführt. Sie wurden 1 min kräftig mit dem Vortex geschüttelt und bis Minute 9:30 stehen gelassen. Das Röhrchen wurde nochmal für 1 min mit dem Vortex geschüttelt und dann direkt 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit 5 ml RPMI-Medium (10 mM Glucose, 37 °C) gewaschen und nochmals 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde wieder abgesaugt und das Zellpellet mit 1 μ l RPMI (10 mM Glucose) je gesammelter Insel mithilfe einer Eppendorfpipette gründlich resuspendiert. Es wurden je 45 μ l der Zellsuspension entnommen und gleichmäßig auf je 3 Zellkulturschälchen verteilt (\varnothing 35 mm, mit Nunclon Delta Surface von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) für rein elektrophysiologische Messungen bzw. μ -Dish von ibidi (Martinsried, D) für einfache oder simultane mikrofluorimetrische Messungen). Dabei wurde ein kleiner Tropfen möglichst mittig platziert. So wurden die einzelnen Zellen zunächst für 2,5–3 h im Brutschrank inkubiert, um ein erstes Absetzen zu ermöglichen, und anschließend vorsichtig mit 2,5 ml RPMI-Medium (5 mM Glucose, 37 °C) gefüttert, ohne sie wieder aufzuwirbeln. Nach 1–2 Tagen in Kultur (37 °C und 5 % CO₂) wurden die fest angewachsenen β -Zellen vermessen.

3.6 Patch-Clamp-Versuche

3.6.1 Die Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik ist ein elektrophysiologisches Messverfahren, das 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann etabliert wurde und durch welches es möglich wurde Ionenströme im Picoamperebereich darzustellen. Dadurch konnte erstmals das Verhalten von Gruppen bestimmter und sogar einzelner Ionenkanäle beobachtet und charakterisiert werden. Zudem ist es ein deutlich sanfteres Verfahren als die klassische *Voltage-Clamp*-Technik (Spannungsklemme), auf der es aufbaut und bei der mit zwei scharfen Elektroden in die zu untersuchende Zelle eingestochen wird. Folglich ist die Patch-Clamp-Technik für den Einsatz an kleineren und wenig robusten Zellen, wie z.B. einzelnen β -Zellen deutlich besser geeignet. Im Gegensatz zu der Spannungsklemme befindet sich die Messelektrode hier in einer hauchdünn ausgezogenen Patchpipette, die mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist und über die durch bloßes Aufsetzen und leichtes Ansaugen ein dichter Kontakt mit der Zellmembran bzw. zum Zellinneren aufgebaut wird. Die Referenzelektrode kann ohne weitere Berührung der Zelle lose im Zellbad positioniert werden (Neher and Sakmann 1976; Neher, Sakmann, and Steinbach 1978).

Der Name leitet sich von dem „*Patch*“, also dem Flecken der Zellmembran ab, welcher nach Aufsetzen der Patchpipette auf eine Zelle von deren Öffnung umschlossen wird. In dieser sogenannten *cell attached*-Konfiguration (Abb. 3.2A) können die einzelnen Ionenkanäle, die sich in diesem *Patch* befinden, vermessen werden. Ausgehend davon können abhängig vom weiteren Vorgehen und vom jeweiligen Ziel des Versuchs verschiedene weitere Konfigurationen eingestellt werden.

Durch kurzen kräftigen Unterdruck in der Pipette wird der Membranfleck unter der Pipette zerrissen und es entsteht eine offene Verbindung zwischen der Elektrolytlösung in der Pipette und dem Cytosol, wodurch es zu einem ungehinderten Austausch von Ionen und zellulären Bestandteilen kommt (Abb. 3.2B). In dieser *whole cell*-Konfiguration werden Membranströme durch die gesamte Zellmembran gemessen („Ganzzelleableitung“) und die Gesamtheit der darin verankerten Ionenkanäle kann untersucht werden (Hamill et al. 1981). Eine Variante davon ist die *perforated patch*-Konfiguration, bei der mithilfe von Porenbildnern (Nystatin, Amphotericin B) in der Pipettenlösung Löcher in dem Membranpatch entstehen, die ebenfalls einen Austausch von Ionen ermöglichen, für den Durchtritt der Zellkompartimente und größerer Moleküle ($MG \geq 200$ g/mol) aber einen zu geringen Durchmesser (ca. 8 Å) haben (Horn and Marty 1988; de Kruijff et al. 1974; de Kruijff and Demel 1974; Rae et

al. 1991) (Abb. 3.2C). So bleibt die Physiologie der Zelle, wie z.B. Stoffwechselvorgänge, weitestgehend unbeeinträchtigt. Dieser Vorteil wurde in dieser Arbeit für die Messungen des Membranpotentials genutzt.

Wird die Pipette nach Etablierung einer festen Verbindung mit der Zellmembran wieder von der Zelle weggezogen, sodass der Patch aus der Membran herausgerissen wird, entsteht ausgehend von der *cell attached*-Konfiguration der sogenannte *inside-out patch* (Abb. 3.2D) bzw. ausgehend von der *whole cell*-Konfiguration der *outside-out patch* (Abb. 3.2E).

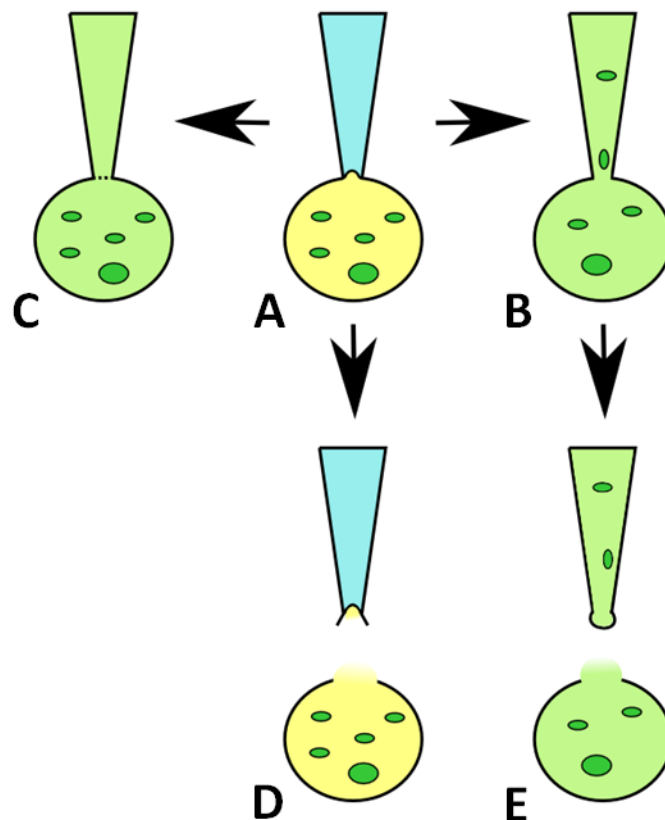


Abbildung 3.2: Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik (A) *Cell attached*: Die Pipettenöffnung sitzt auf der Zelle auf und schließt dicht mit der Membran ab. (B) *Whole cell*: Durch starken Unterdruck wird ein Loch in die Membran gerissen, freier Austausch zwischen Pipettenlösung und Cytosol. (C) *Perforated patch*: Nystatin oder Amphotericin B in der Pipettenlösung bewirken die Ausbildung von Poren in dem von der Pipette umschlossenen Membranbezirk, begrenzter Austausch kleinerer Moleküle und Ionen. (D) *Inside-out patch*: das fest an der Pipettenmündung haftende Membranstück wird aus der Zelle herausgerissen, die Membraninnenseite ist zum Zellbad gerichtet. (E) *Outside-out patch*: Ausgehend vom *Whole cell* wird vorsichtig der die Pipette umgebende Membranbezirk aus der Zelle herausgerissen, dabei verschmelzen die äußeren Kanten, die Membranaußenseite ist zum Zellbad gerichtet.

3.6.2 Das Set-up

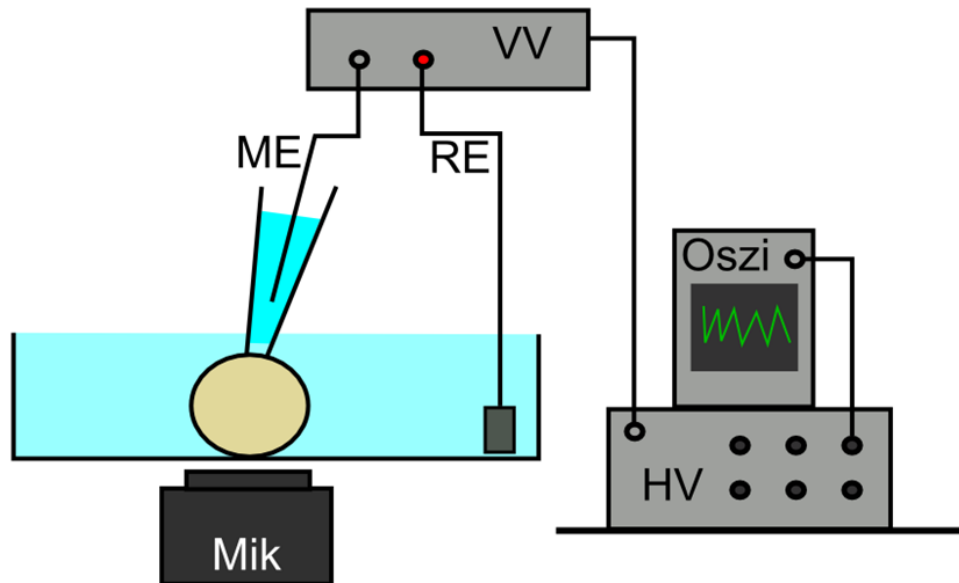


Abbildung 3.3: Grundlegende Komponenten des Patch-Clamp-Set-ups Die Zelle wird im Zellbad über einem inversen Mikroskop (Mik) positioniert. Die am Vorverstärker (VV) angebrachte Patchpipette ist mit einem Elektrolyten gefüllt, in den die Messelektrode (ME) ragt. Die Referenzelektrode (RE) ist lose im Zellbad platziert. Das Signal des Vorverstärkers wird an den Hauptverstärker (HV) weitergeleitet und mit einem Oszilloskop (Oszi), PC oder Schnellschreiber dargestellt.

Die elementaren Bestandteile eines Patch-Clamp-Messplatzes (Abb. 3.3) sind ein inverses Mikroskop, auf dem das Zellbad positioniert wird, und die Verstärkeranlage, zu der der Vorverstärker (VV) inklusive Pipettenhalter, Messelektrode (ME) und Referenzelektrode (RE), der Hauptverstärker (HV) mit Erdung und ein Oszilloskop, ein Schreiber oder ein Computer gehören, die das gemessene Signal darstellen.

Für die Realisierung der Versuche sind allerdings weitere Komponenten nötig. Das Mikroskop muss auf einem schwingungsgedämpften Tisch gelagert werden, damit keinerlei Erschütterungen die empfindliche Verbindung zwischen Patchpipette und Zelle beeinträchtigen können. Außerdem sind das Mikroskop sowie alle direkt mit dem Zellbad verbundenen Bauteile zur Abschirmung gegen Störspannungen von einem Faradayschen Käfig umgeben und ebenso wie die Verstärkeranlage geerdet. Die Zellen sollten während eines Versuchs ständig mit frischer extrazellulärer Lösung (EZ) versorgt werden, um durchgehend gleichbleibende Bedingungen zu gewährleisten und einen Austausch des Zellbades gegen wirkstoffhaltige EZ zu ermöglichen. Dafür wurden spezielle Zu- und Ablaufsysteme entwickelt. Für die nötigen Über- und Unterdrücke in der Pipette während der Annäherung und Abdichtung der Zelle ist ein

3-Wege-Hahn mit einem angeschlossenen U-Rohr über einen dünnen Schlauch mit dem Pipettenhalter verbunden. Des Weiteren ist der Vorverstärker zunächst auf einem Grobtrieb und zusätzlich auf einem durch einen hydraulischen Mikromanipulator (Wasser oder Öl) gesteuerten Feintrieb montiert, wodurch eine exakte Positionierung der Patchpipette in x-, y- und z-Achse möglich ist. Die einzelnen Komponenten und weiteren Bestandteile der zwei in diesem Projekt genutzten Set-ups werden im Folgenden genauer beschrieben.

a) Das „EPC7-Set-up“

Kontinuierliche Messungen des Membranpotentials oder -stroms, mikrofluorimetrische Messungen der Calciumkonzentration oder des mitochondrialen Membranpotentials, sowie simultan durchgeführte elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Messungen wurden an einem bereits etablierten Arbeitsplatz durchgeführt. Kernstück dieses Set-ups war der Patch-Clamp-Verstärker EPC7 (HEKA Elektronik, Lambrecht, D), weshalb es in dieser Arbeit „EPC7-Set-up“ genannt wird. Das analoge Messsignal wurde mit einem aktiven Tiefpassfilter mit 4-poliger Besselcharakteristik (Model AF 173, Thomatronik, Rosenheim, D) gefiltert und über einen analog/digital-Wandler (Digital Data Recorder VR-10B CRC Instrutech Corp., Longmont, CO, USA) an einen Thermoschreiber (TA 240, Gould Recorder Systems), den Computer mit der Patch-Clamp-Software (pCLAMP 6.03, Axon Instruments, Union City, CA, USA) und zur Speicherung der Daten auf Videokassette an einen Videorecorder (D-VRS2, Toshiba, Tokyo, JPN) weitergeleitet. Der A/D-Wandler war mit einem Mikrofon ausgestattet, sodass während der Versuche wichtige Informationen auf Band gesprochen werden konnten. Dem Computer war außerdem noch ein DMA Interface (TL-1, Axon Instruments, Union City, CA, USA) mit analog/digital-Wandlung vorgeschaltet (Abb. 3.4B).

Das inverse Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Jena, D) war mit einem 40er-Objektiv mit weitem Arbeitsabstand (LD-Achroplan, 40x/ 0,60 Korr, Zeiss, Jena, D) für die Elektrophysiologie sowie zwei Ölimmersionsobjektiven (Fluar, 100x/ 1,3, Zeiss, Jena, D und FL40/ 1,3, Fluoreszenz, Leitz, Wetzlar, D) für die Fluoreszenzmikroskopie ausgestattet und stand auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Typ LT 100/80-A4SISA, Barry Controls, Raunheim, D) (Abb. 3.4A). Der Vorverstärker wurde über einen Grobtrieb an einem selbstgebauten Stativ befestigt, welches über Bohrungen und Schrauben auf dem Tisch fixiert wurde. Auch der Tisch, in den das Zellbad eingesetzt wurde, war zunächst an diesem Stativ und ohne Kontakt mit dem Mikroskop befestigt.

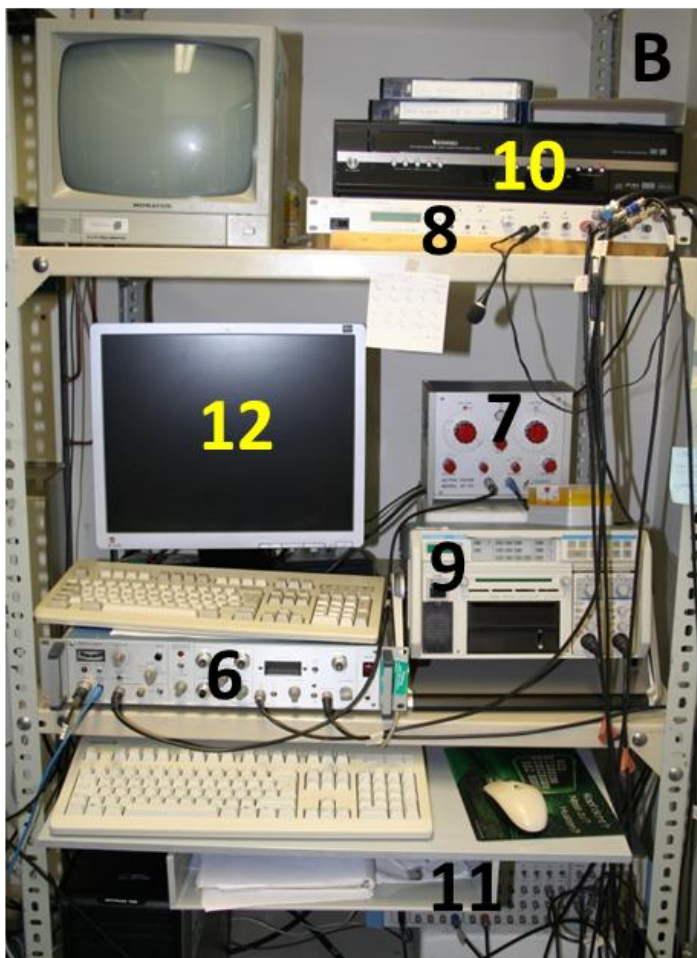
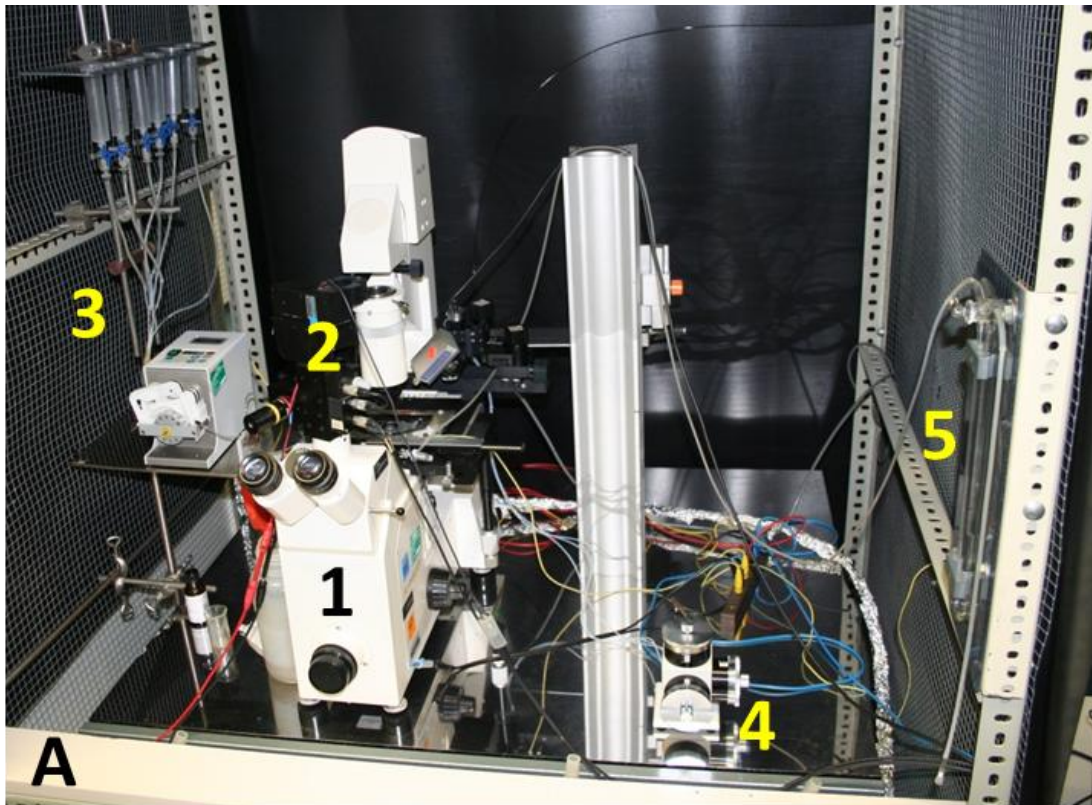


Abbildung 3.4: EPC7-Set-up

(A) Inverses Mikroskop (1) mit CCD-Kamera (2) auf schwingungsgedämpftem Tisch in Faradayschem Käfig mit Zulaufsystem (3), Mikromanipulator (4) und Über-/ Unterdrucksystem (5)

(B) EPC7-Verstärker (6), aktives Filter (7), A/D-Wandler (8), Thermoschreiber (9), Videorecorder (10), DMA Interface (11) und PC-Bildschirm (12).

Im Laufe des Projektes kam es jedoch trotz des schwingungsgedämpften Tisches zu makroskopisch sichtbaren Schwingungen der Pipettenspitze, weshalb der Grobtrieb des Vorverstärkers später direkt am Mikroskoptisch angebracht wurde, in dem auch das Zellbad saß. Auf diese Weise konnten die Schwingungen zwar nicht unterbunden werden, sie verliefen dadurch aber so synchron, dass es zu keiner relativen Bewegung zwischen Pipettenspitze und Zelle mehr kam. Der Feintrieb des Vorverstärkers wurde über einen wassergefüllten Mikromanipulator (MHW-3, Narishige Scientific Instrument LAB, Tokyo, JPN) angesteuert. Vor dem Umbau war der Shutter (Shutter Driver Model D122, Uniblitz, Vincent Associates, Rochester, NY, USA), der den Durchgang des Anregungslichtes für die Fluoreszenzmikroskopie steuerte, direkt am Mikroskop befestigt. Da dieser ebenfalls leichte Erschütterungen auslöste, wurde er im Anschluss durch Aufhängen an dem Stativ vom Mikroskop entkoppelt.

Der Zulauf der Lösungen zum Zellbad erfolgte wie beim „EPC9-Set-up“ beschrieben zunächst rein hydrostatisch über Schläuche und wurde mit einem 6-Wege-Hahn reguliert. Für eine bessere Bedienbarkeit bei Fluoreszenzmessungen im Dunkeln wurde es später ebenfalls umgebaut. Für die gleichmäßige Zufuhr wurde eine digitale Schlauchpumpe (Ismatec ISM597D, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, D) zwischengeschaltet und über 3-Wege-Hähne an den jeweiligen Reservoirs zwischen den Versuchslösungen gewechselt (Abb. 3.4A). Gleichzeitig wurde der Flüssigkeitsüberstand kontinuierlich mithilfe einer weiteren Schlauchpumpe (Minipuls 2, Gilson, Middleton, WI, USA) abgesaugt. Ein gleichbleibender Flüssigkeitspegel wurde durch eine entsprechende Ausfräsung in einem eigens entwickelten Plexiglaseinsatz für das Zellbad gewährleistet (Abb. 3.5). Bei den Elektroden handelte es sich um Ag/AgCl-Elektroden. Wegen der besseren elektrochemischen Stabilität bestand die Referenzelektrode aus einem Silberdraht mit einem gesinterten Ag/AgCl-Pellet (EP2, Ø 2,0 mm x 4 mm, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

Weitere Komponenten dieses Set-ups, die nur im Zuge mikrofluorimetrischer Messungen genutzt wurden, werden in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

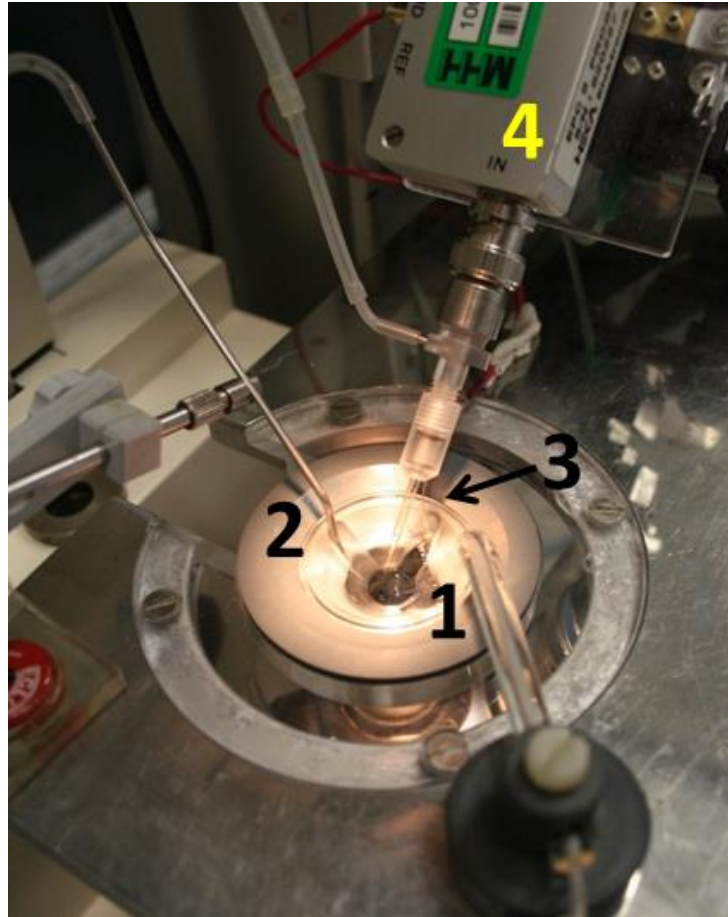


Abbildung 3.5: Zellbad mit Plexiglaseinsatz für Patch-Clamp-Versuche Schlauchhalter für Zulauf frischer EZ (1) Absaugung (2), Referenzelektrode (3) und Vorverstärker mit Pipettenhalter und Patchpipette (4).

b) Das „EPC9-Set-up“

Für die Untersuchung und Charakterisierung spannungsgesteuerter Calciumkanäle wurde ein zusätzliches Set-up neu in Betrieb genommen. Hier kam ein EPC9-Patch-Clamp-Verstärker (HEKA Elektronik, Lambrecht, D) zum Einsatz, weshalb dieser Messplatz als „EPC9-Set-up“ bezeichnet wird. Da die analog/digital-Wandlung, Signalfilterung und Datenspeicherung durch den Patch-Clamp-Verstärker und die Patch-Clamp-Software (Pulse 8.0, HEKA Elektronik, Lambrecht, D) bewerkstelligt wurde, beschränkte sich die Zahl der elektronischen Geräte zur Datenakquisition und -darstellung auf den Verstärker und den Computer (Abb. 3.6B).

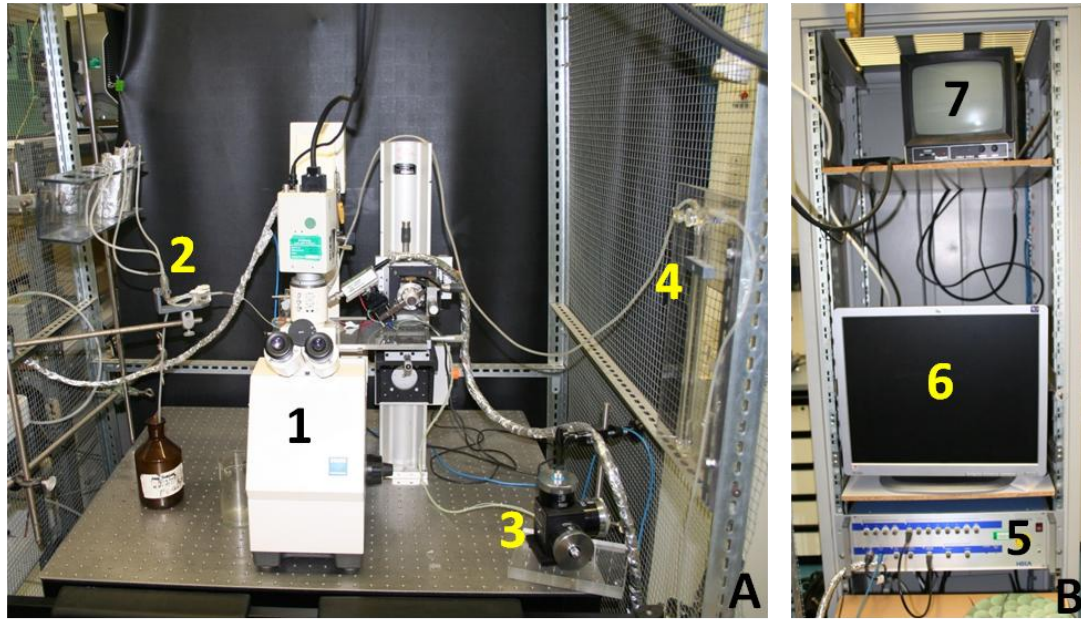


Abbildung 3.6: EPC9-Set-up (A) Inverses Mikroskop (1) auf schwingungsgedämpftem Tisch in Faradayschem Käfig mit Zulaufsystem (2), Mikromanipulator (3) und Über-/ Unterdrucksystem (4) (B) EPC9-Verstärker (5), PC-Bildschirm (6) und Bildschirm für die Mikroskopkamera (7).

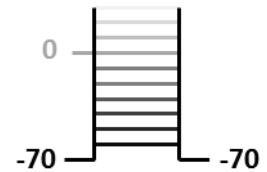
Das inverse Mikroskop (Axiovert 10, Zeiss, Jena, D) war mit einem 10er-Objektiv (EF, 10x/ 0,25, Phaco1, Leitz, Wetzlar, D) und einem 40er-Objektiv mit weitem Arbeitsabstand (LD-Achroplan, 40x/ 0,60 Korr, Zeiss, Jena, D) ausgestattet und stand auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Optical Breadboard, LW3036B-OPT, Newport, Irvine, CA, USA). Der Vorverstärker wurde über einen Grobtrieb an einem selbstgebaute Stativ befestigt, welches über Bohrungen auf dem Tisch fixiert wurde. Auch der Tisch, in den das Zellbad eingesetzt wurde, war an diesem Stativ und ohne Kontakt mit dem Mikroskop befestigt (Abb. 3.6A). Der Feintrieb des Vorverstärkers wurde über einen mit Öl gefüllten Mikromanipulator (MO-103, Narishige Scientific Instrument LAB, Tokyo, JPN) angesteuert. Zur einfacheren optischen Kontrolle der Verbindung von Pipette und Zelle war auf dem Mikroskop eine Kamera (Color Video Camera, TK-1070E, JVC, Yokohama, JPN) montiert, deren Bild von einem zusätzlichen kleinen Bildschirm dargestellt wurde. Der Zulauf der EZ (mit oder ohne Testsubstanzen) erfolgte rein hydrostatisch aus höher gelagerten Glasgefäßen aus denen Schläuche zu einem 6-Wege-Hahn führten, von dem aus ein Schlauch bis ins Zellbad ragte. Nach Füllung der Schläuche mit der jeweiligen Versuchslösung, konnte durch Umliegen des Hahns die jeweils gewünschte Lösung in das Zellbad fließen. Wie beim EPC7-Set-up wurde die Flüssigkeit kontinuierlich mit einer Schlauchpumpe

(Minipuls 2, Gilson, Middleton, WI, USA) abgesaugt und ein konstanter Pegel aufrechterhalten.

Folgende Stimulationsprotokolle wurden genutzt:

a) „cvtest“

| Segments | | #1 | #2 | #3 |
|-----------------|--------------------------|-----------------------|-----|-------------------|
| No. of Sweeps | 10 | V _{Hold} | -60 | V _{Hold} |
| Sweep Interval | 1.00 s | 15 | 100 | 10 |
| Sample Interval | 250 μ s (4.0 kHz) | | 10 | |
| | | Δ V-incr. (mV) | | |

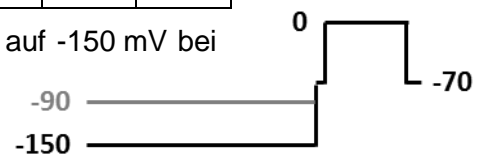


Nur Test auf messbare Ca²⁺-Ströme, keine Datenspeicherung.

b) „testpuls -150“

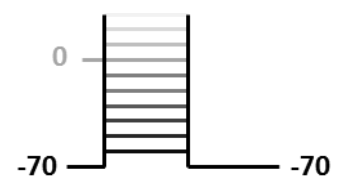
| Segments | | #1 | #2 | #3 | #4 |
|-----------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|----|-------------------|
| No. of Sweeps | 2 | -150 | V _{Hold} | 0 | V _{Hold} |
| Sweep Interval | 5.00 s | 95 | 1 | 10 | 5 |
| Sample Interval | 100 μ s (10.0 kHz) | | | | |
| | | Δ V-incr. (mV) | 60 | | |

Test auf β -Zell-Natriumkanal, der nach Hyperpolarisation auf -150 mV bei 0 mV öffnet, bei -90 mV aber nicht mehr aktivierbar ist.



c) „cv“

| Segments | | #1 | #2 | #3 |
|-----------------|---------------------------|-----------------------|-----|-------------------|
| No. of Sweeps | 10 | V _{Hold} | -60 | V _{Hold} |
| Sweep Interval | 1.00 s | 30 | 100 | 125 |
| Sample Interval | 300 μ s (3.33 kHz) | | 10 | |
| | | Δ V-incr. (mV) | | |



Depolarisationsleiter zur Erstellung einer „Current/Voltage-Kurve“ (Stromspannungskurve).

3.6.3 Versuchsvorbereitung

Zu Beginn eines Versuchstages wurden die benötigten Versuchslösungen und ggf. die Nystatin-haltige Pipettenlösung frisch hergestellt (Kap. 3.3.2, 3.3.4, 3.4.6). Dafür wurde die EZ (Kap. 3.4.5) auf Raumtemperatur erwärmt und mit der jeweiligen Stammlösung oder Substanz zu der entsprechenden Konzentration gemischt. Eine kleine Menge der Pipettenlösung wurde in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß für das *tip-filling* der Pipetten

bereitgestellt. Ein weiterer Teil, im Falle der perforated patch-Versuche Nystatin-haltig, wurde mit einer 2 ml-Spritze (Injekt®, B. Braun, Melsungen, D) aufgezogen, die mit einem Sterilfilter (Filtropur S plus 0,2 µm) und einer Pipettenspitze mit flexibler und sehr dünn ausgezogener Spitze für das *back-filling* versehen war. Bei lichtempfindlichen Substanzen (Dihydropyridine und Nystatin) wurde das Behältnis in Alufolie gewickelt, die Spritze mit der Nystatinlösung wurde außerdem auf Eis gelagert.

Zudem wurden jeden Tag frisch Patchpipetten ausgezogen. Dafür wurden Glaskapillaren (Borosilikatglas, AD 2,0 mm, WS 0,3 mm, Hilgenberg, Malsfeld, D), die zuvor auf 7,5 cm Länge zugeschnitten worden waren, mit einem vertikalen Pipettenziehgerät (Patch Pipette Puller L/M-3P-A, List Medical Electronics, Darmstadt, D) in zwei Schritten zu zwei Patchpipetten ausgezogen. Im ersten Schritt wurde bei höherer Stromstärke bzw. höherer Temperatur der Neigungswinkel der Spitze festgelegt. Im zweiten Schritt wurden die zwei Pipetten bei geringerer Temperatur auseinander gerissen. Über die hier eingestellte Stromstärke kann man dabei den Durchmesser der Pipettenöffnung regulieren, der im Versuch als Pipettenwiderstand messbar wird. Für Versuche in der perforated patch-Konfiguration wurden Widerstände von 2,5–3,5 MΩ, für die whole cell-Konfiguration wurden 3,5–4,5 MΩ angestrebt, was einem etwas kleineren Öffnungsdurchmesser entspricht. Dieser ist gewünscht, um die Zelle beim Zerreißen der Membran weniger stark zu belasten. Tatsächlich schwankten die erzielten Pipettenwiderstände trotz gleichbleibender Einstellungen zwischen 2,5 und 5,5 MΩ. Im Anschluss wurden die Pipetten mit dem Platindraht einer Microforge (Coating/Polishing Microforge CPM-2, ALA Scientific Instruments, Farmingdale, NY, USA) zum Glätten eventueller scharfer Kanten hitzepoliert. Die Pipetten wurden aufrecht in einer Halterung und zusätzlich in einer Box mit Deckel gelagert, um die empfindlichen Spitzen zu schützen und zu verhindern, dass sich Partikel aus der Luft darauf absetzen konnten.

Unmittelbar vor Beginn des Versuchs wurde ein Schälchen mit kultivierten β-Zellen (Kap. 3.5.4) aus dem Brutschrank genommen, das Medium abgegossen, einmal vorsichtig mit EZ gewaschen und mit EZ aufgefüllt. Nach Einsetzen des Plexiglaseinsatzes, wurde dieses versuchsbereite Zellbad in die Halterung über dem Mikroskop gesetzt. Der Zulaufschlauch, der Absaugstutzen und die Referenzelektrode wurden in den dafür vorgesehenen Ausfräsungen platziert und abgewartet bis sich der gewünschte Flüssigkeitspegel eingestellt hatte (Abb. 3.5).

3.6.4 Versuchsdurchführung

Sämtliche elektrophysiologischen Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

a) Messungen des Membranpotentials einzelner β -Zellen (EPC7)

Nach Vorbereitung des Zellbades (EZ aus Kap. 3.4.5a) wurde zunächst mit dem 40er-LD Objektiv eine geeignete, frei liegende β -Zelle mit glatter Oberfläche gesucht und im mittleren Sichtfeld positioniert. Anschließend wurde eine frische Patchpipette erst mit der Spitze in die Pipettenlösung (Kap. 3.4.6a) eingetaucht (*tip-filling*) und dann etwa zur Hälfte von hinten mit der nystatinhaltigen Pipettenlösung befüllt (*back-filling*). Luftbläschen in der Pipette wurden durch Gegenschnipsen vollständig entfernt und die Pipette im Pipettenhalter des Vorverstärkers befestigt. Mithilfe des mit Wasser gefüllten U-Rohrs wurde nun ein leichter Überdruck auf die Pipette gegeben, um nach Eintauchen in das Zellbad eine Vermischung der Pipettenlösung mit EZ in der Pipette und ein Anhaften von Partikeln an der Pipettenspitze zu verhindern. Der EPC7 wurde eingeschaltet und die Grundeinstellungen (Verstärkung: 20 mV/pA, Modus: Search, Slow Range: Off, V_{Hold} : 0 mV und Stim.scaling: 0,001) ausgewählt. Beim Rechner war das Programm FetchEx der pCLAMP-Software geöffnet und der Testpuls (0,2 mV, 50 ms) lief. Beim Eintauchen der Pipette in das Zellbad schloss sich der Stromkreis und eine Stromantwort auf den Testpuls wurde messbar, aus der sich der Pipettenwiderstand errechnete.

Mithilfe des Grobtriebs und unter optischer Kontrolle wurde die Pipette in die Nähe der Zelle gebracht. Mit dem Feintrieb wurde sie dann vorsichtig immer näher an die Zelle herangefahren, wobei nun der Pipettenwiderstand zur Kontrolle diente. Sobald die Pipettenspitze leicht auf der Membran aufsetzte, wurde die Öffnung faktisch kleiner, was einen Anstieg des Widerstandes zur Folge hatte. Es wurde so weiter verfahren, bis ein Widerstand von etwa 10 M Ω erreicht war. Durch Umlegen des 3-Wege-Hahns wurde der Überdruck von der Pipette genommen und eine Verbindung zu einem Schlauch mit Mundstück geschaffen. An diesem wurde nun leicht, aber konstant gesaugt, bis die Zellmembran so dicht an bzw. bereits in die Pipettenöffnung gezogen wurde, dass es zu einer Abdichtung zwischen Zellmembran und Pipette kam, die im gigaohmigen Bereich lag, dem sogenannten Gigaseal (Hamill et al. 1981). Die Verstärkung wurde auf 2 mV/pA, der Modus auf „VC“ (*Voltage Clamp*), das Haltepotential V_{Hold} auf -50--70 mV und das Stim.scaling auf -0,1 eingestellt. Das Low-Pass-Potentiometer des aktiven Filters wurde von 5 auf 10 und der Multiplier von 1 auf 10 kHz erhöht und V_{Hold} auf exakt -70 mV eingestellt. Der „Slow Range“ wurde auf 10 gestellt, sodass die beim Testpuls sichtbaren kapazitiven Ströme entlang der Pipette

mit dem C-Fast-Schalter kompensiert werden konnten. Anschließend wurde der Modus auf „CC“ (*Current Clamp*) gestellt und abgewartet, bis über die Nystatinporen ein Zugang zum Zellinneren entstanden war, was an einem gemessenen Membranpotential von -60–70 mV erkennbar war. Wurde dieses β -Zell-Ruhemembranpotential unter den gegebenen Bedingungen (5 mM Glucose, Raumtemperatur) nicht erreicht, sondern blieb es bei etwa -40 mV, war dies ein Hinweis darauf, dass es sich bei der gepatchten Zelle um eine α -Zelle anstatt einer β -Zelle handeln könnte, und es wurde mit einer anderen Zelle und einer frischen Pipette neu begonnen. Bei einer kurzen Kontrolle im VC-Modus konnten die nun stärkeren kapazitiven Ströme entlang der Zellmembran mit dem C-Slow-Schalter kompensiert werden und überprüft werden, ob der Seal noch dicht war. Dieser Kapazitätswert (6–10 pF) wurde notiert, da er als Parameter für die Zellgröße gilt. Außerdem wurde die Leitfähigkeit, die ein Parameter für die Anzahl und Größe der Nystatinporen ist, mit dem G-Series-Schalter abgeglichen. Sie lag zu Beginn einer Messung im Schnitt bei 0,013 μ S.

Zurück im CC-Modus konnte die Messung durch Starten der Video-Aufzeichnung und des Schreibers begonnen werden. War das gemessene Potential stabil, wurde zur nächsten Versuchslösung gewechselt. Es dauerte etwa eine Minute bis das Zellbad vollständig ausgetauscht war und erste Reaktionen von Wirkstoffen mit schneller Kinetik, wie z.B. Tolbutamid, erkennbar wurden. Sobald sich ein stabiles Verhalten eingestellt hatte, wurde zur nächsten Lösung gewechselt. Zum Schluss einer Messung wurde mit EZ gewaschen und, wenn möglich, eine Rückkehr zum Ruhemembranpotential abgewartet. Zwischenzeitlich wurde hin und wieder im VC-Modus der Seal überprüft (dicke, schwarze Balken in der Potentialspur der Registrierungen).

Die Auswertung dieser Messungen erfolgte manuell anhand der Schreiberausdrucke, welche beim Abspielen der Videokassetten mit beliebiger Geschwindigkeit und Verstärkung erstellt werden konnten.

b) Messungen des Membranstroms einzelner β -Zellen (EPC7)

Die Vorbereitung des Versuchs verlief im Grunde wie bei den Membranpotentialmessungen, nur dass Pipetten mit etwas höherem Widerstand, also etwas kleineren Öffnungsdurchmessern gezogen wurden (Kap. 3.6.3) und die Pipettenlösung für die *whole cell*-Konfiguration (Kap. 3.4.6b) genutzt wurde. Nach Erreichen des Gigaseals wurden am EPC7-Controller die Einstellungen Verstärkung: 2 mV/pA, Modus: VC, V_{Hold} : -70 mV, Stim.scaling: -0,1 und Slow Range: 10 gewählt

und am Filter das Low-Pass-Potentiometer auf 10 und der Multiplier auf 10 kHz hochgedreht. Nach dem C-Fast-Abgleich für die Pipettenkapazität wurde einmal kräftig an dem Mundstück gesogen, um einen Unterdruck in der Pipette zu bewirken, der so stark war, dass ein Loch in die Membran gerissen wurde. Dies war durch einen deutlichen Anstieg der kapazitiven Ströme der Zellmembran zu erkennen, die nun wieder über C-Slow abgeglichen wurden. Auch G-Series musste aufgrund der großen Öffnung in der Membran und der dadurch stark erhöhten Leitfähigkeit deutlich hochgedreht werden ($\approx 0,076 \mu\text{S}$). Gleichzeitig steigt auch der sogenannte Serienwiderstand zwischen Mess- und Referenzelektrode, der sich entlang der Pipette und der Zellmembran ausbildet und durch Membrantrümmer und Organellen im Bereich der Pipettenspitze zusätzlich erhöht wird. Dieser Widerstand wird ebenfalls durch G-Series kompensiert. Durch leichten Über- oder Unterdruck in der Pipette können diese Partikel teilweise aus der Mündung heraus gespült werden. Die Kontrolle des Membranpotentials im CC-Modus zeigte, ob auch hier das Ruhemembranpotential von -60 – -70 mV messbar war.

Anschließend wurde vom Programm FetchEx zu ClampEx gewechselt. Hier konnten unterschiedliche Stimulationsprotokolle gewählt werden. In dieser Arbeit wurde nur ein Protokoll genutzt, bei dem ausgehend vom Haltepotential alle 1,25 Sekunden für je 250 ms im Wechsel um 10 mV hyper- bzw. depolarisiert wurde (Stim.scaling 0,01) (Abb. 3.7). Für diese Versuche wurde im VC-Modus ein Haltepotential von -50 mV eingestellt, so dass das Kommandopotential während der Pulse auf -40 bzw. -60 mV sprang. Der Versuch wurde mit Starten der Stimulation, der Videoaufnahme und des Schreibers begonnen und der resultierende Membranstrom parallel zur Stimulationsspur aufgezeichnet. Es wurde jeweils zur nächsten Versuchslösung bzw. am Ende zum Auswaschen auf EZ gewechselt und über mehrere Minuten beobachtet, dass sich ein stabiler Zustand einstellte.

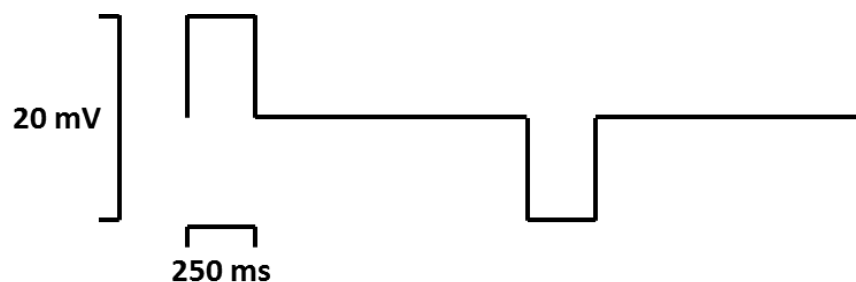


Abbildung 3.7: Stimulationsprotokoll (EPC7) Alle 1,25 s wurden einzelne β -Zellen ausgehend vom Haltepotential V_{Hold} für 250 ms im Wechsel um 10 mV de- bzw. hyperpolarisiert.

Die Auswertung erfolgte wie bei den Messungen des Membranpotentials manuell anhand der Schreiberausdrucke.

c) Messungen des Calciumstroms (EPC9)

Für diese Versuche wurden Pipetten für whole cell-Versuche (Kap. 3.6.3), EZ mit TEA zur unselektiven Blockade von Kaliumströmen (Kap. 3.4.5b) und die Pipettenlösung für Ca^{2+} -Kanalmessungen (Kap. 3.4.6c) genutzt. Letztere enthielt 3 mM ATP, um zusätzlich Kaliumströme durch ATP-abhängige Kaliumkanäle zu unterdrücken. Das Patch-Clamp-Programm Pulse wurde geöffnet und die Grundeinstellung „Set-up“ (Verstärkung: 5 mV/pA, Haltepotential: 0 mV, Modus: On Cell, Testpuls: 5 mV, 5 ms, single) ausgewählt. Das Zellbad wurde wie zuvor beschrieben vorbereitet, eine geeignete Zelle gesucht und die mit Lösung gefüllte Pipette in dem Halter des Vorverstärkers befestigt. Vor Eintauchen der Pipettenspitze in das Schälchen wurde ein Überdruck angelegt. Solang die Pipettenöffnung frei in das Zellbad ragte, kam es zu einer leichten Diffusion der Pipettenlösung in die EZ und dadurch zu einer Veränderung des *Liquid Junction Potentials*, was sich durch ein Abdriften des Stroms von der Nulllinie bei einem Haltepotential von 0 mV bemerkbar machte. Dies wurde durch Drücken des „LJ-Auto“-Buttons kompensiert. Die Pipettenspitze wurde zunächst mithilfe des Grobtriebs und anschließend mithilfe des Mikromanipulators an die Zelle herangebracht und auf die Membran aufgesetzt, bis ein Pipettenwiderstand von etwa 13 M Ω gemessen wurde. Nachdem der Überdruck von der Pipette genommen worden war, wurde konstant und gleichmäßig an dem Mundstück gesogen, sodass die Zellmembran an bzw. in die Pipette gezogen wurde, wodurch es zur Ausbildung des Gigaseals kam. Die Pipettenkapazität wurde über „CFast“ abgeglichen. Anschließend wurde auf eine von der Arbeitsgruppe von Andrea Welling (TU München) programmierte Einstellung gewechselt. Dadurch wurden die Verstärkung auf 10 mV/pA, das Haltepotential auf -80 mV und der Modus auf *Whole Cell* umgestellt. Das Haltepotential musste dann noch auf -70 mV korrigiert werden, um es dem Ruhemembranpotential der β -Zelle anzupassen. Dann wurde durch kurzes, kräftiges Saugen am Mundstück ein Loch in die Membran gerissen und so die *whole cell*-Konfiguration erreicht. Die deutlich stärkeren kapazitiven Ströme entlang der Zellmembran wurden mit „CSlow“ und die Serienwiderstände (s. b) mit „RSeries“ kompensiert. Manchmal führte diese starke mechanische Belastung zu einer Undichtigkeit zwischen Pipette und Zellmembran, was durch das Auftreten eines messbaren Stromflusses beim Haltepotential von -70 mV erkennbar war. Solang diese Undichtigkeit sehr gering war (≤ 10 pA), konnte sie mit der Leak compensation rechnerisch kompensiert werden. War jedoch eine Kompensation um 1 nS nötig, wurde

der zu messende Strom durch Kanäle zu sehr überdeckt und der Versuch musste abgebrochen werden. War die Zell-Pipetten-Verbindung nach dem Durchsaugen weiterhin stabil, konnte mit dem Stimulationsprotokoll „cvtest“ (Kap. 3.6.2b) überprüft werden, ob bei dieser Zelle ein Ca^{2+} -Strom mit einem Maximum bei etwa 0 mV messbar war.

Es wird beschrieben, dass β -Zellen einen spannungsabhängigen, Tetrodotoxin (TTX)-sensitiven Natriumkanal besitzen, welcher allerdings bei physiologischen Membranpotentialen inaktiviert ist (halbmaximale Inaktivierungsspannung ($V_{h,\beta}$) = -100–109 mV, Plant 1988; Göpel et al. 1999). Da pankreatische α - und δ -Zellen ebenfalls über solche TTX-sensitiven Na^+ -Kanäle verfügen, diese aber bei deutlich geringeren Potentialen inaktivieren ($V_{h,\alpha}$ = -42–50 mV (Barg et al. 2000; Göpel, Kanno, Barg, Weng, et al. 2000), $V_{h,\delta}$ = -28 mV (Göpel, Kanno, Barg, and Rorsman 2000)), galt dies lange Zeit als Möglichkeit zur Identifizierung von β -Zellen in *Voltage Clamp*-Experimenten. Aufgrund dieser Tatsache wurde mit dem Protokoll „testpuls -150“ (Kap. 3.6.2b) anfänglich ein Test auf den β -Zell- Na^+ -Kanal durchgeführt. Dabei wurde die Zelle im ersten Schritt über 95 ms bei -150 mV konditioniert, um die Na^+ -Kanäle in einen aktivierbaren Zustand zu bringen, und anschließend der Einwärtsstrom bei 0 mV registriert. Im zweiten Schritt erfolgte die Konditionierung bei -90 mV. War ein beim ersten Schritt gemessener starker (Nanoampere-Bereich) und schnell inaktivierender (innerhalb von 5 ms) Strom im zweiten Schritt nicht mehr registrierbar, so sollte die Zelle als β -Zelle identifiziert sein (Abb. 3.8A).

Spätere Veröffentlichungen mit molekularbiologischen Versuchen und exakteren Vorgehensweisen in der Identifizierung der Inselzellen (RT-PCR, Immunocytochemie) zeigten allerdings ein weniger eindeutiges Verhalten. Vignali et al. (2006) konnten bei α -Zellen nur einen früh inaktivierenden Na^+ -Strom ($V_{h,\alpha}$ = -106 mV) nachweisen, während β -Zellen hier sowohl den früh inaktivierenden ($V_{h,\beta,fi}$ = -104 mV) als auch teilweise einen verbleibenden Na^+ -Strom ($V_{h,\beta,res}$ = -59 mV) aufwiesen. Zhang et al. (2014) beobachteten sowohl bei α - als auch bei β -Zellen Na^+ -Ströme mit biphasischen Inaktivierungskurven (doppelte Boltzmann-Funktion). In β -Zellen machte der früh inaktivierende Strom mit 85 % den Großteil des Gesamtnatriumstroms aus und inaktivierte bei etwas geringeren Potentialen als bei den Kollegen ($V_{h,\beta,fi}$ = -95 mV), während der verbleibende Strom ($V_{h,\beta,res}$ = -50 mV), welcher nur bei 30 % der Zellen zu messen war, einen deutlich geringeren Anteil hatte. Bei 100 % der α -Zellen war die Biphasizität der Inaktivierung zu erkennen ($V_{h,\alpha,fi}$ = -84 mV, $V_{h,\alpha,res}$ = -47 mV), wobei der früh inaktivierende und der verbleibende Natriumstrom etwa das gleiche Ausmaß hatten. Zudem wurde nachgewiesen, dass sowohl α - als auch β -Zellen die

Natriumkanäle $\text{Na}_V1.3$ und $\text{Na}_V1.7$ exprimieren (Zhang et al. 2014), allerdings in ungleichen Verhältnissen. Bei β -Zellen überwiegt $\text{Na}_V1.7$, in α -Zellen wird vermehrt $\text{Na}_V1.3$ exprimiert, was die unterschiedlichen Inaktivierungscharakteristiken erklärt. Aufgrund dieser Daten und Unstimmigkeiten bei eigenen Messungen (gar kein messbarer Na^+ -Strom, Restnatriumstrom bei -90 mV trotz hoher Zellmembrankapazität, Abb. 3.8B und C) wurde der „testpuls -150 “ nicht mehr zur β -Zell-Identifizierung genutzt.

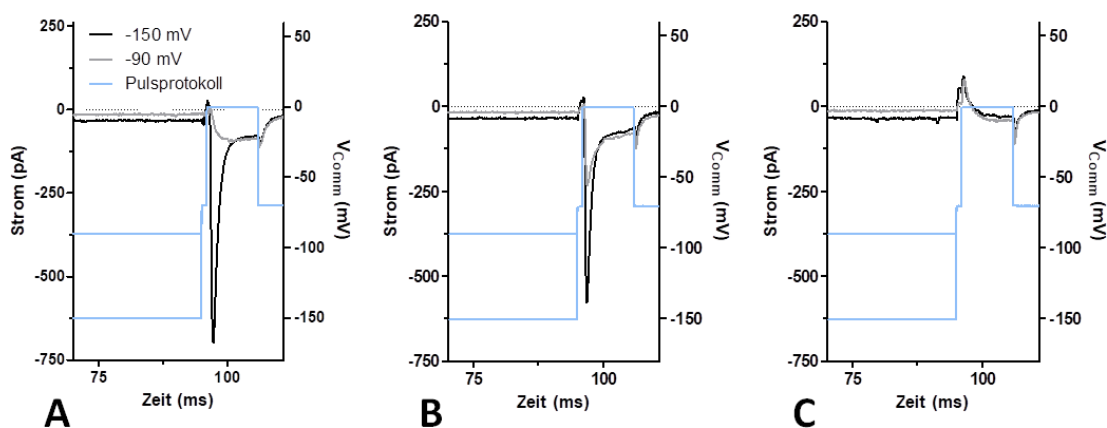


Abbildung 3.8: Stimulationsprotokoll und beispielhafte Registrierungen für Test auf β -Zell- Na^+ -Kanal Die blauen Linien zeigen den Spannungsverlauf des Stimulationsprotokolls, der gemessene Strom bei -150 mV-Prepuls ist in schwarz, der bei -90 mV in grau dargestellt. **(A)** β -Zell-Verhalten entsprechend der Literatur: Starker, schnell inaktivierender Einwärtsstrom nach -150 mV-Konditionierungspuls, nach Konditionierung auf -90 mV nur noch deutlich schwächerer nicht inaktivierender Ca^{2+} -Strom registrierbar. **(B)** Vermeintlich charakteristische Registrierung einer A-Zelle: Auch nach -90 mV Prepuls ist noch ein Rest-Natriumstrom messbar. **(C)** Kein starker, transienter Stromfluss bei Depolarisation auf 0 mV erkennbar.

Stattdessen wurden andere Parameter und Verhalten berücksichtigt. Zum Einen ist bekannt, dass β -Zellen deutlich größer sind als α - und δ -Zellen, was in Patch-Clamp-Versuchen anhand der Membrankapazität (C_m) festgestellt werden kann ($C_{m,\beta} = 6,1\text{--}7,4$ pF, $C_{m,\alpha} = 3,3\text{--}5,0$ pF, $C_{m,\delta} = \text{ca. } 4,4$ pF, (Barg et al. 2000; Göpel et al. 1999; Göpel, Kanno, Barg, Weng, et al. 2000). Zum Anderen wurde in α -Zellen ein transienter (ca. 50 ms), TEA-resistenter Kaliumstrom nachgewiesen („A-Strom“, Smith, Bokvist and Rorsman 1989; Göpel et al. 2000), der in den Voltage Clamp-Versuchen als Auswärtsstrom zu erkennen ist. Als dritter Punkt zählt die relative Häufigkeit der β -Zellen in den Inselzellpräparaten. β -Zellen machen bei Mäusen etwa $70\text{--}80\%$ der

gesamten Langerhans'schen Insel aus, während es bei δ -Zellen nur ca. 5–10 % sind. Außerdem sitzen die β -Zellen bei Mäusen vermehrt im Kern der Inseln (Cabrera et al. 2006). Sollten bei der Präparation der Inseln oberflächliche Zellen zu Schaden gekommen sein, würde das den relativen Anteil der β -Zellen im Einzelzellpräparat sogar noch erhöhen. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei einer Zelle mit einer Membrankapazität größer 6 pF, die in Anwesenheit von 20 mM TEA keinen erkennbaren transienten Auswärtsstrom aufweist, nicht um eine β -Zelle handelt, ist folglich sehr gering.

Bei einem deutlich identifizierbaren Ca^{2+} -Einwärtsstrom wurden mit dem Protokoll „cv“ (Kap. 3.6.2b) alle 30 bis 60 sek Stromspannungskurven („I/V-Kurven“) aufgezeichnet, bis der maximale Einwärtsstrom etwa konstant war. Anschließend wurde auf die jeweilige Versuchslösung gewechselt und weiter regelmäßig I/V-Kurven registriert, bis sich wiederum ein stabiles Verhalten eingestellt hatte.

Die Datenauswertung erfolgte mit den Analyse-Programmen Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) und OriginPro 2016G (OriginLab, Northampton, MA, USA) und wird in Abb. 3.9 veranschaulicht. Beim Durchlaufen des Stimulationsprotokolls wurde bei jedem der zehn Spannungspulse eine Stromkurve aufgezeichnet und online aus den jeweiligen Einwärtsstrommaxima eine I/V-Kurve erstellt (pA über mV). Da die Stromstärke mit zunehmender Zellgröße bzw. -oberfläche aufgrund der höheren Kanalanzahl zunimmt, wurden die Werte durch die Zellkapazität (C_m) geteilt, wodurch sich ein Wert für die Stromdichte (pA/pF) ergab. So waren die Ergebnisse unabhängig von der variierenden Zellgröße und ließen sich besser vergleichen. Nach Normalisierung auf einen internen Kontrollwert vor Zugabe der jeweiligen Testsubstanz wurden außerdem chronologische Graphen der Versuchverläufe erstellt, aus denen später die Kinetiken ermittelt wurden (Abb. 3.9D).

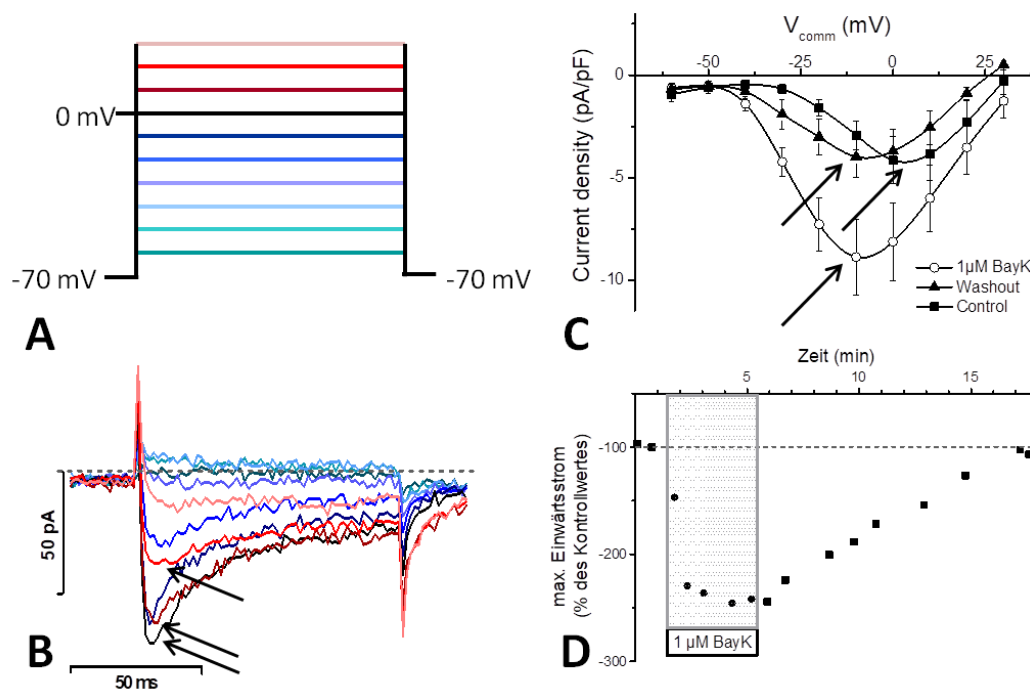


Abbildung 3.9: Stimmulationsprotokoll und Auswertung der Voltage Clamp-Versuche zur Untersuchung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (VDCC) (A) Stimmulationsprotokoll. Einzelne β -Zellen wurden im konventionellen *whole cell*-Modus gepatcht und im *Voltage Clamp* auf ein Haltepotential von -70 mV eingestellt. Beim Durchlaufen des Stimmulationsprotokolls wurden die Zellen für je 100 ms in 10 steigenden 10 mV Schritten depolarisiert (-60 bis +30 mV), zwischen den Depolarisationsschritten wurden die Zellen für 900 ms wieder auf -70 mV gebracht (nicht vollständig dargestellt). (B) Stromkurven. Während dieser Stimulation wurde der zwischen den Elektroden fließende Strom gemessen. Die gestrichelte Linie stellt den Nullstrom dar. Ein davon ausgehender Ausschlag nach unten ist dabei als Einwärtsstrom positiv geladener Teilchen in die Zelle zu interpretieren. Die aus den einzelnen Kommandospannungen resultierenden Stromkurven wurden farblich codiert um die jeweilige Zugehörigkeit kenntlich zu machen. (C) Stromspannungskennlinien (I/V-Kurven). Die gemessenen Spitzeneinwärtsströme (Pfeile in B) wurden als Stromdichte (Strom (pA) / Zellkapazität (pF)) in Abhängigkeit vom jeweiligen Kommandopotential aufgetragen, woraus die für das Öffnungsverhalten von VDCC charakteristischen v-förmigen Kurven resultieren. Je eine beispielhafte Kurve für die Aufzeichnung vor, während und nach Wirkstoffexposition. (D) Chronologische Darstellung eines gesamten Versuchs. Die jeweiligen Maxima (Pfeile in C) aller im Laufe des Versuchs aufgenommenen I/V-Kurven wurden mit Bezug auf den Wert vor Zugabe der Testsubstanz normalisiert und über der Zeit aufgetragen. Jeder Punkt steht für die Aufzeichnung einer I/V-Kurve, der Kasten markiert den Zeitraum, in dem die Zellen mit der Testsubstanz umströmt wurden. (C+D) Versuche aus Kapitel 4.1, Effekt des L-Typ Ca^{2+} -Kanalöffners Bay K8644.

3.7 Mikrofluorimetrische Messungen

3.7.1 Bestimmung der freien, cytosolischen Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$)

Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ist ein Schlüsselereignis der Stimulus-Sekretions-Kopplung der β -Zellen. Es wurde deshalb in ausschließlich mikrofluorimetrischen Messungen, aber auch simultan mit Messungen des Membranpotentials oder der Insulinsekretion untersucht. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften kamen dabei die beiden Fluoreszenzindikatoren Fura-2 LeakRes und Fluo-4 zum Einsatz.

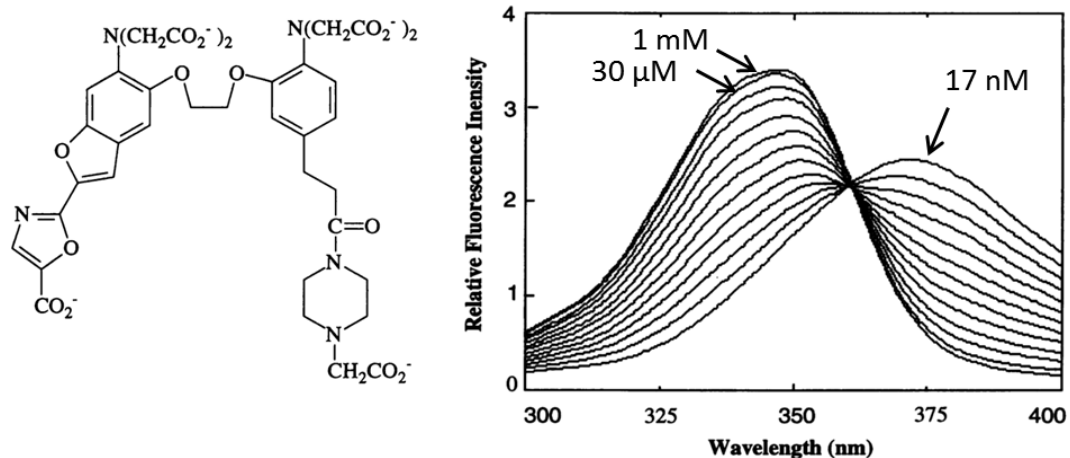


Abbildung 3.10: Struktur von Fura-2 LeakRes und Absorptionsspektren in Abhängigkeit von der freien Calciumionenkonzentration (0,017–1000 μ M) (Vorndran, Minta, and Poenie 1995)

Fura-2 ist ein ratiometrischer Farbstoff, der Calcium unter Ausbildung eines Chelatkomplexes bindet und dessen Absorptionsmaximum sich in Abhängigkeit der freien Calciumkonzentration zu geringeren Wellenlängen hin verschiebt (Abb. 3.10), während sich das Emissionsspektrum nur geringfügig verändert. Im Versuch wird mit 340 und 380 nm angeregt und das emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 510 nm gemessen. Durch Ratiobildung der zwei unmittelbar nacheinander aufgenommenen Fluoreszenzen (F_{340}/F_{380}) werden Werte erhalten, die mit zunehmender Calciumkonzentration steigen, aber unanfällig sind für eine Veränderung der Indikatorkonzentration durch Auslaufen oder Ausbleichen des Farbstoffs, ungleichmäßige Beladung oder ungleichmäßige Schichtdicken des zu vermessenden Gewebes. Die letzten beiden Punkte waren ein klarer Vorteil bei der Vermessung ganzer Pankreasinseln, weshalb es für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ intakter Inseln genutzt wurde. Allerdings hat Fura eine recht hohe Affinität zum Calcium, wodurch es ab

Konzentrationen von etwa 50 μM abgesättigt ist, die Fluoreszenzratio sich also kaum mehr verändert.

Durch den Einsatz des Derivates Fura-2 LeakRes (auch „Fura-PE3“), das durch einen 1-Carbonyl-Piperazinessigsäure-Rest einen zwitterionischen Charakter hat, wurde ein „Auslaufen“ des Farbstoffes sowie die Akkumulation in Zellkompartimenten größtenteils verhindert. Das Auslaufen führte bei dem ursprünglichen Fura-2 dazu, dass die Fluoreszenzintensität nach einer Stunde um etwa 90 % abgenommen hatte, während bei dem neueren Derivat zum gleichen Zeitpunkt noch etwa 70 % der initialen Intensität messbar war (Grynkiewicz, Poenie, and Tsien 1985; Vorndran et al. 1995). Im weiteren Text wird die vereinfachte Bezeichnung „Fura-2“ genutzt.

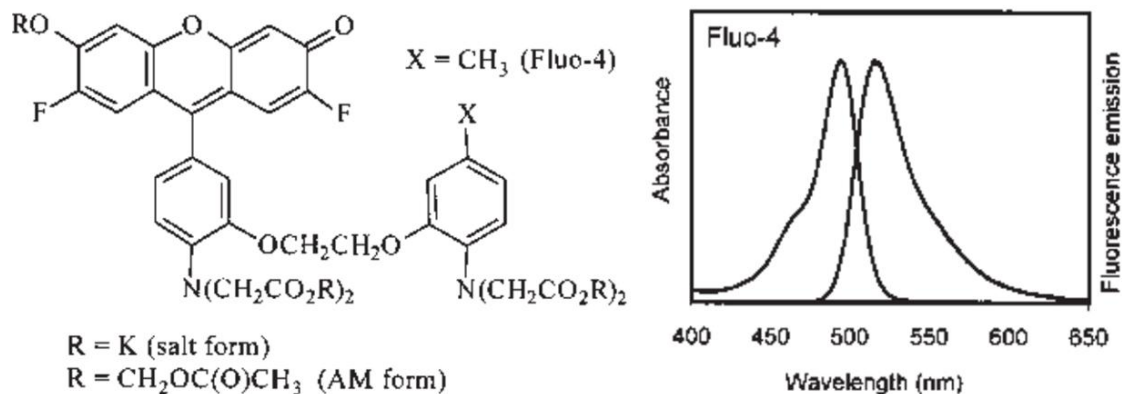


Abbildung 3.11: Struktur und Absorptions-/Emissionsspektrum von Fluo-4 (Gee et al. 2000)

Fluo-4 dagegen fluoresziert nach Calciumbindung mit gleichbleibenden Absorptions- und Emissionsspektren (Abb. 3.11), hat aber eine geringere Affinität zu Calcium als Fura-2. Dadurch ist die Auflösung bei höheren Calciumkonzentrationen besser. Fluo-4 wurde bei der Vermessung einzelner β -Zellen genutzt (Gee et al. 2000).

Bei beiden Calciumindikatoren fand die Beladung der Zellen in Form ihrer nicht fluoreszierenden aber membranpermeablen Acetoxymethylester (AM) statt. Nach enzymatischer Esterhydrolyse im Cytosol waren sie weitestgehend membranimpermeabel.

a) Versuche mit Fluo-4

Sowohl einfache Fluoreszenzmessungen als auch solche, bei denen simultan das Membranpotential einzelner β -Zellen registriert wurde, wurden am „EPC7-Set-up“ (Kap. 3.6.2b) durchgeführt. Dafür wurde Licht der Wellenlänge 490 nm von einer Xenonlampe (Spectrofluorometer MARK I, Farrand Optical, Valhalla, NY, USA) zu dem inversen Mikroskop und über einen dichroitischen Spiegel zum Präparat geleitet. Das von den Zellen emittierte Licht >510 nm wurde von dem Spiegel durchgelassen und zu einer Photomultiplier-Kamera (H6240-01, Hamamatsu, Hamamatsu, JPN) weitergeleitet (Abb. 3.12). Die Messung erfolgte unter Kontrolle von Labtech Notebook (Burr-Brown, Filderstadt, D).

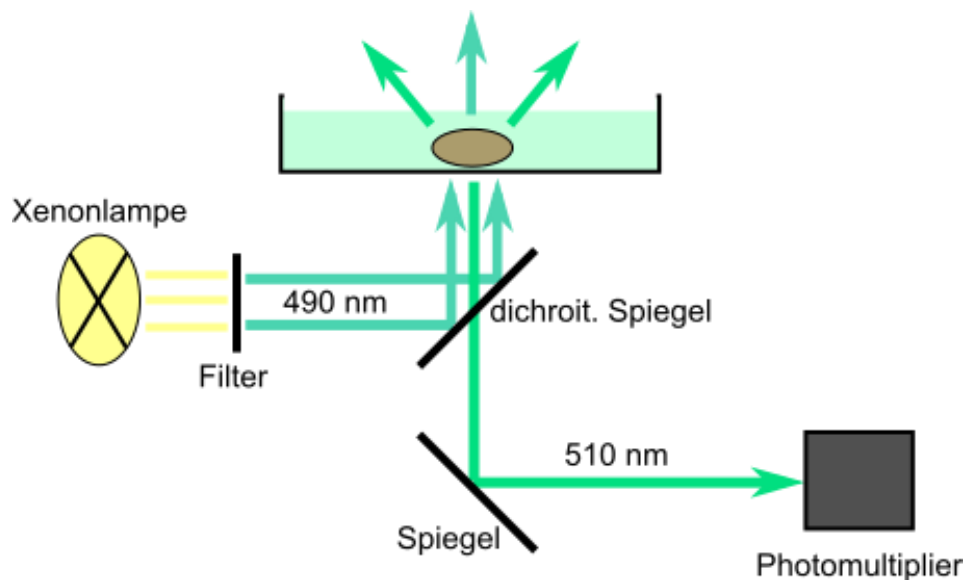


Abbildung 3.12: Prinzip der Fluoreszenzmessung mit dichroitischen Spiegeln Mithilfe eines Filters kann aus dem Licht der Xenonlampe ein definierter Wellenlängenbereich herausgefiltert und zum Mikroskop geleitet werden. Ein dichroitischer Spiegel, der diese Wellenlänge reflektiert, leitet es weiter zum Präparat. Das von der Zelle emittierte Licht wird vom dichroitischen Spiegel gezielt durchgelassen und zum Detektor geführt.

Die Versuchslösungen wurden wie für Membranpotentialmessungen mit EZ (Kap. 3.4.5a) hergestellt. Die 1–2 Tage alten, in Zellkulturschalen (μ -Dish von ibidi, Martinsried, D) angewachsenen einzelnen β -Zellen (Kap. 3.5.4) wurden mit EZ gewaschen und für 20 min mit 1 μ M Fluo-4 (Kap. 3.3.3) in EZ im CO_2 -Inkubator beladen. Anschließend wurde das Beladungsmedium entfernt und erneut mit EZ gewaschen. Mit einem passenden Plexiglaseinsatz (Kap. 3.6.3) bestückt wurde die

Zellkulturschale in das Mikroskop eingesetzt und Zu- und Ablauf sowie ggf. die Referenzelektrode für die Potentialmessung positioniert. Mit dem 40er Ölimmersionsobjektiv (FL40/ 1,3, Fluoreszenz, Leitz, Wetzlar, D) wurde eine geeignete, freiliegende Zelle herausgesucht und das Sichtfeld der Kamera so angepasst, dass es die Zelle möglichst passend umschloss. Der Raum wurde vollständig abgedunkelt und das Durchlicht des Mikroskops ausgeschaltet. Mit Labtech Notebook wurde die Messung gestartet. Dabei wurden die Zellen mit einer Frequenz von 2 Hz für 100 ms belichtet und die Fluoreszenz registriert. Der Wechsel zwischen den verschiedenen Versuchslösungen fand zu vorher festgelegten Zeiten oder nach Erreichen eines stabilen Zustandes statt.

Bei simultanen Messungen von $[Ca^{2+}]_i$ und Membranpotential wurde, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern, vor Beginn der Messung in möglichst kurzer Zeit eine Verbindung zwischen Patchpipette und Zelle aufgebaut und bei ausgeschaltetem Licht abgewartet, bis sich mithilfe des Nystatins der Zugang zum Zellinnern ausgebildet hatte (s. Kap. 3.6.4a). Der Versuch wurde gestartet, sobald sich ein stabiles Membranpotential eingestellt hatte.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

b) Versuche mit Fura-2

Für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ intakter Inseln (Kap. 3.5.3b) wurde das Deckgläschen mit den angewachsenen Inseln im Zellkulturschälchen mit frisch hergestellter KR (Kap. 3.4.1b) gewaschen und bei 37 °C unter Begasung mit Carbogen mit 1,6 μ M Fura-2 (Kap. 3.3.3) beladen. Nach einer Beladungszeit von 45 min wurde das Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette entnommen, mit KR gespült und auf eine speziell angefertigte Kammer geklemmt, sodass die angewachsenen Inseln zum Kammerinnern gerichtet waren und so zunächst mit KR und im Laufe des Versuchs mit den entsprechenden Testlösungen perfundiert werden konnten (Abb. 3.13).

Die Kammer wurde auf einem inversen Mikroskop (Axiovert 135TV, Zeiss, Jena, D) mit einem Ölimmersionsobjektiv (FL40/ 1,3, Fluoreszenz, Leitz, Wetzlar, D) für einfache Calciummessungen bzw. Fluor-Objektiv (10x/ 0,5 N.A., Zeiss, Jena, D) für Messungen mit gleichzeitiger Bestimmung der Sekretionsrate fixiert. Die zulaufenden Lösungen wurden in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert. Ein konstanter Zu- und Ablauf wurde durch eine digitale Peristaltikpumpe (Ismatec ISM597D, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, D) gewährleistet. Bei Versuchen, bei denen gleichzeitig die Insulinsekretion

gemessen werden sollte, wurde das Eluat mit einem Fraktionssammler (Cygnet, Isco, Lincoln, NE, USA) aufgefangen.

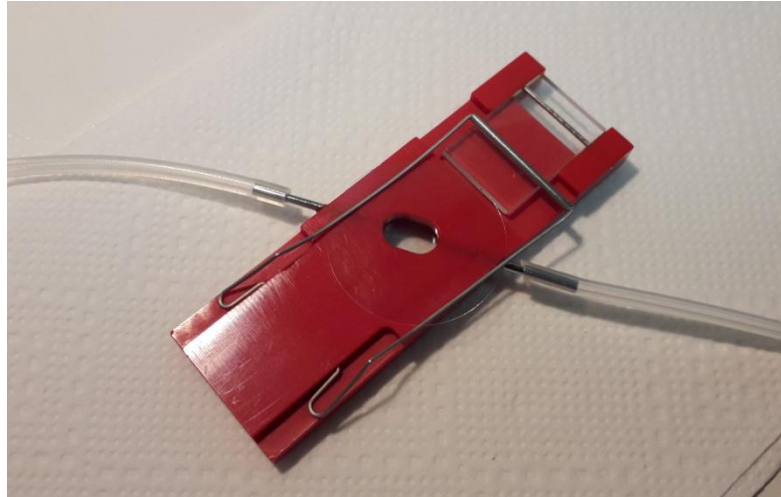


Abbildung 3.13: Perifusionskammer für Fura-Messungen Die kleine ovale Aussparung ist die eigentliche Kammer, die beidseitig mit Deckgläschen abgedichtet wird. Auf dem oberen, sichtbaren Deckgläschen sind dem Kammerlumen zugewandt die zu untersuchenden Inseln angewachsen. Über die zwei Schläuche werden die Lösungen zu und abgeführt und gegebenenfalls mit einem Fraktionssammler aufgefangen.

Der gesamte Versuch wurde über die Software Visiview (Visitron Systems, Puchheim, D) angesteuert. Die Anregung erfolgte alle 30 oder 60 sek bei einer Wellenlänge von 340 und 380 nm (Xenonlampe Polychrome V, Till Photonics, Gräfelfing, D). Das von den Inseln emittierte Licht wurde durch einen dichroitischen Spiegel mit einer Transmission bei 510 ± 40 nm gefiltert und mit einer CCD-Kamera (Spot Pursuit 1,4 MP monochrom, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) registriert. Es wurden 7 „regions of interest“ (ROI) festgelegt, deren Fluoreszenz aufgenommen wurde: eine ROI neben der Insel, um später die Hintergrundfluoreszenz abziehen zu können, eine ROI in der Mitte der Insel und fünf weitere in ihrer Peripherie. Mithilfe der Software wurde bereits online die Ratio der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten ermittelt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Die Gehaltsbestimmung des Insulins im Eluat mittels ELISA wird in Kap. 3.8.3 beschrieben.

3.7.2 Messungen des mitochondrialen Membranpotentials mit Rhodamin123

Der Glucosemetabolismus und die anschließende ATP-Gewinnung in den Mitochondrien der β -Zellen sind essentielle Elemente der Stimulus-Sekretions-Kopplung. Nach der Glykolyse im Cytosol wird das dabei entstandene Pyruvat genutzt, um über Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien letztendlich ATP zu gewinnen. Das abschließende Ereignis dieser Reaktionskette, die ATP-Synthese, wird von einem Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran angetrieben, der im Zuge der Atmungskette aufgebaut wird. Dieser elektrochemische Gradient wird auch als „protonenmotorische Kraft“ bezeichnet und setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: dem pH-Gradienten (ΔpH) sowie dem mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\psi_m$), welches durch eine negativ geladene Mitochondrienmatrix gegenüber dem Intermembranraum charakterisiert ist.

Somit kann das mitochondriale Membranpotential als Kennzeichen der Stoffwechselleistung der (β -)Zellen betrachtet werden. Für solche Untersuchungen haben sich lipophile Fluoreszenzfarbstoffe mit delokalisierte positiver Ladung als besonders geeignet herauskristallisiert. Aufgrund ihrer Lipophilie können sie Biomembranen relativ leicht passieren. Angetrieben durch den Spannungsgradienten der Plasma- sowie der Mitochondrienmembran wandern sie elektrophoretisch in die negativ geladene Mitochondrienmatrix und werden dort angereichert; und dies umso mehr je stärker das Membranpotential ist. Einer der am häufigsten eingesetzten Indikatoren ist Rhodamin123 (Rh123). Es zeichnet sich im Gegensatz zu vielen anderen Farbstoffen mit den gleichen chemischen Eigenschaften durch sehr geringe Cytotoxizität aus. Außerdem ist es vergleichsweise schwach lipophil, sodass es bei der Beladung in wässrigem Medium keines weiteren Lösemittels bedarf (Johnson, Walsh, and Chen 1980).

Darzynkiewicz et al. (1982) zeigten, dass das Fluoreszenzspektrum von Rh123 nach Aufnahme in die Zellen beziehungsweise Mitochondrien einen 12-nm-red-shift erfährt, welchem mutmaßlich die Bildung eines Komplexes zugrunde liegt. Emaus, Grunwald, and Lemasters (1986) beobachteten zudem eine Abnahme der Rh123-Fluoreszenz, nachdem isolierte Mitochondrien in eine Rhodamin-haltige Pufferlösung gegeben wurden, sowie einen erneuten Fluoreszenzanstieg nach Zugabe eines Entkopplers der Atmungskette, welcher eine Depolarisation der Mitochondrienmembran bewirkt. Diese paradoxe Reaktion wurde weiter untersucht und auf ein „Self-Quenching“ nach Aggregation zurück geführt. Aus Abb. 3.14 geht hervor, dass die Rhodamin-Fluoreszenz bis zu einer Konzentration von 10 μM proportional zur Konzentration

ansteigt, ab 30 μM das *Self-Quenching* eintritt und die Fluoreszenz wieder abnimmt, bis sie bei etwa 1 mM ein Minimum erreicht (Métivier et al. 1998). Warum tritt dieses Phänomen nun ebenfalls in Zellen auf, die üblicherweise mit Konzentrationen von 1–26 μM Rh123 beladen werden? Nach Murphy (1997) führen Potentialschritte von 61,5 mV zu einem je 10-fachen Anstieg der Kationen- bzw. Farbstoffkonzentration. Die ca. -70 mV der Plasmamembran ergeben demnach zusammen mit den für gewöhnlich mehr als -120 mV der Mitochondrienmembran eine Konzentration in den Mitochondrien, die 3–4 10er-Potenzen über der Farbstoffkonzentration im Beladungsmedium und somit im millimolaren Bereich liegt.

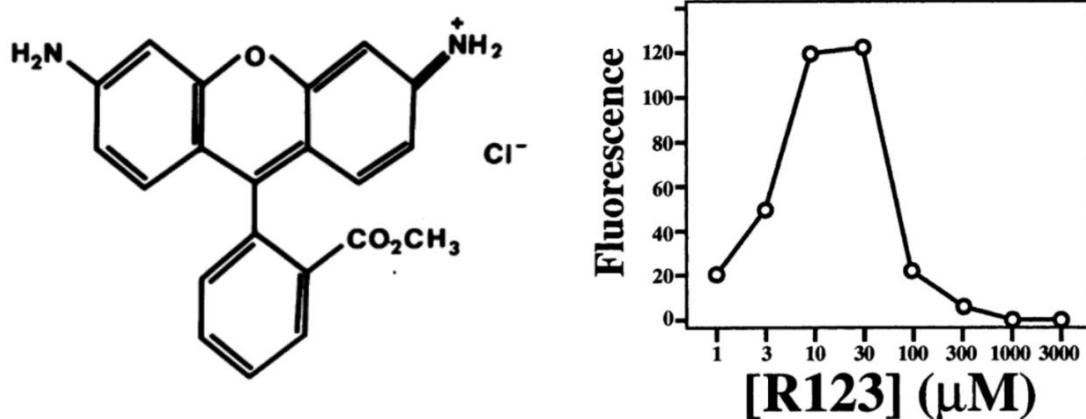


Abbildung 3.14: Struktur (Johnson et al. 1980) und Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Rhodamin123 (Métivier et al. 1998)

Die Abb. 3.14 lässt vermuten, dass höhere Beladungskonzentrationen eine geringere Sensitivität bei leichten Membranpotentialveränderungen zur Folge haben, da die Farbstoffkonzentration im millimolaren Bereich bleiben könnte. Vorabversuche zeigten aber, dass der depolarisierende Effekt von Natriumazid (NaN_3), eines Komplex-IV-Hemmers, in unserem Versuchsaufbau mit einer Beladungskonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ (\triangleq 26,3 μM Rh123) im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen (2 und 5 $\mu\text{g/ml}$) am deutlichsten dargestellt wird.

Außerdem wurden weitere Parameter festgelegt: Das Absorptionsmaximum von Rh123 liegt bei ca. 500 nm, das Emissionsmaximum von Rh123 in Zellen bei 537 nm. Zunächst wurde auch mit der Anregungswellenlänge von 500 nm gearbeitet. Für eine bessere Trennung des Anregungslichtes vom emittierten Licht wird aber oft mit 485 oder 488 nm angeregt. In einer Testreihe zeigte sich, dass bei uns der NaN_3 -Effekt im

Vergleich zu 475 und 485 nm bei 480 nm am deutlichsten erkennbar war. Zudem gab es die deutlicheren Ergebnisse, wenn der rechteckige Bildausschnitt der Kamera die gesamte Zelle inklusive etwas Umgebung erfasste anstatt ausschließlich auf einen Ausschnitt der Zelle eingestellt zu werden.

Die Versuchsdurchführung erfolgte im Allgemeinen wie bei Fluo-4 (Kap. 3.7.1a). Es wurde allerdings davon abweichend mit Krebs-Ringer-Lösung (Kap. 3.4.1a) und nicht mit der extrazellulären Lösung für Patch-Clamp-Versuche gearbeitet. Die angewachsenen einzelnen β -Zellen (Kap. 3.5.4) wurden mit KR gewaschen und für 10 min bei 37 °C mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Rhodamin (Kap. 3.3.3.) beladen. Auch hier sorgte ein dichroitischer Spiegel dafür, dass das Anregungslicht zum Präparat geführt und das emittierte Licht zur Kamera durchgelassen wurde. Das Anregungslicht (480 bzw. 500 nm) musste gefiltert werden (Dichtefilter, 14,8–50 % Transmission, Optics Balzers, Balzers, Liechtenstein), da das Fluoreszenzsignal sonst so stark war, dass es vom Multiplier nicht mehr aufgelöst werden konnte.

3.8 Messungen der Insulinsekretionsrate

Die Insulinsekretion ist die Hauptaufgabe der β -Zellen und somit der wichtigste Parameter bei Untersuchungen der pharmakologischen Wirkung von Substanzen auf die β -Zellfunktion.

3.8.1 Die Perifusionsanlage

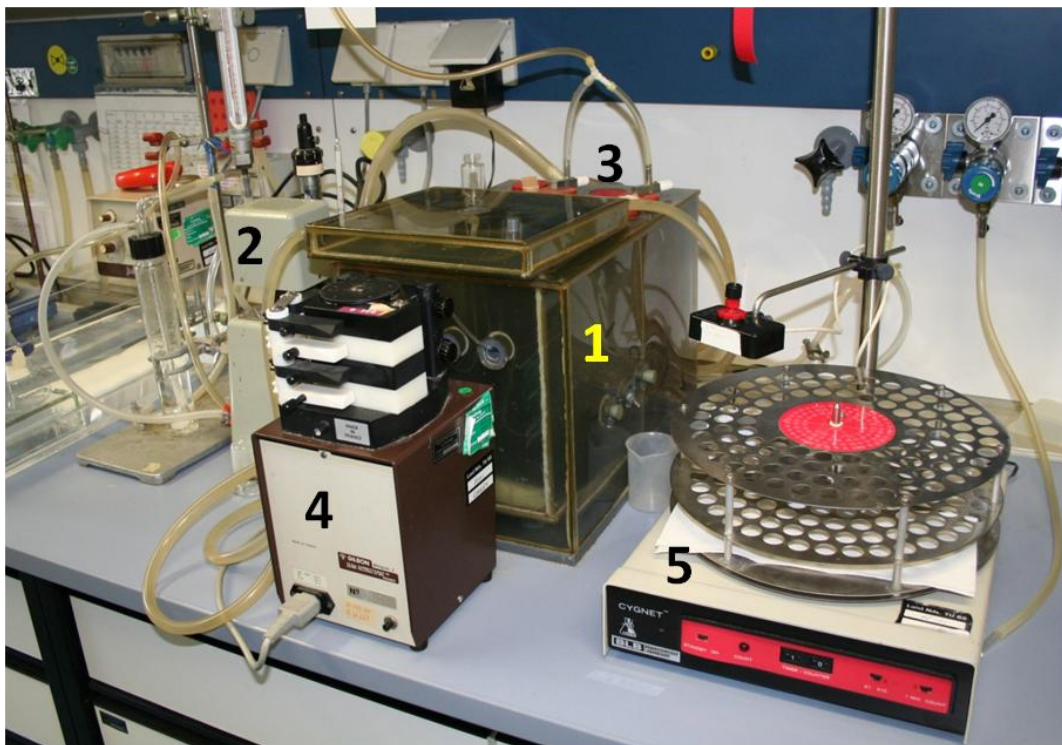


Abbildung 3.15: Perifusionsanlage nach Panten et al. (1977) Der doppelwandige Kasten (1) ist das Kernstück der Anlage. Das Wasserbad (2) liefert das Wasser, mit dem er stetig durchströmt und auf 37 °C temperiert wird. Im hinteren Bereich befinden sich Aussparungen für die mit Medium bzw. Testlösung gefüllten Gläser, die hier ebenfalls temperiert und durchgehend mit Carbogen begast werden (3). Eine Schlauchpumpe (4) befördert die Lösungen zur mit Inseln befüllten Perifusionskammer (s.u.), die im inneren des Kastens fixiert wird, und letztendlich zu einem Fraktionssammler (5).

Zur Bestimmung der Insulinsekretionsrate ganzer Langerhans'scher Inseln kam eine von Panten et al. (1977) entwickelte, selbstgebaute Perifusionsanlage zum Einsatz (Abb. 3.15). Dank des dicken, doppelwandigen Kastens, an den ein Wasserbad (Typ FJ, Haake, Karlsruhe, D) angeschlossen ist, kann das gesamte System konstant auf 37 °C temperiert werden. Dies gilt insbesondere für die Kammer, in der die Inseln platziert werden, sowie für die Vorratsbehälter der verschiedenen

Untersuchungslösungen und die Schläuche, die die Lösungen zu der Kammer transportieren. Nur die Schlauchpumpe (Minipuls 2, Gilson, Middleton, WI, USA) und der Fraktionssammler (Cygnat, Isco, Lincoln, NE, USA) befinden sich außerhalb des Systems und werden nicht temperiert. Außerdem gibt es noch einen Zugang zu den Vorratsgefäßen, über den die Untersuchungslösungen für einen konstanten Sauerstoffgehalt durchgehend mit Carbogen begast werden können.

Die eigentliche Perifusionskammer (Abb. 3.16) besteht aus zwei Teilen, die nach Einlegen eines Nitrocellulose-Membranfilters (MF-Millipore Membrane Filters, 5,0 µm Porengröße, Merck, Darmstadt, D) und zwei Silikondichtungsringen zusammengeschraubt werden. Der Filter dient als Auffangfläche für die Inseln, damit diese in der Kammer verbleiben und nicht von der umströmenden Lösung weggespült werden.

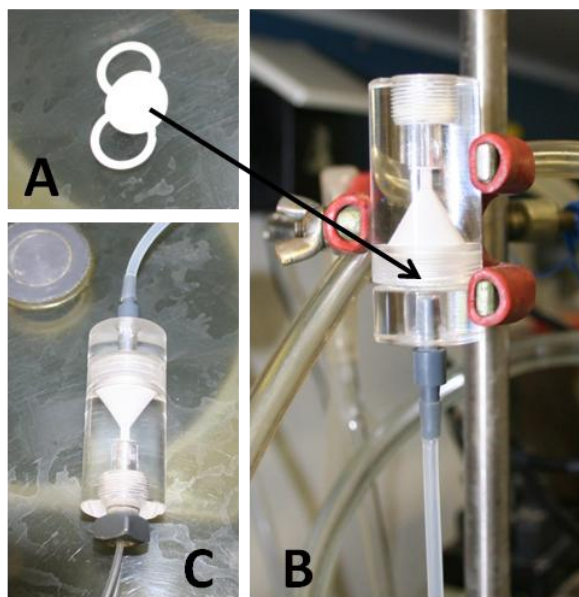


Abbildung 3.16: Perifusionskammer für Messungen der Insulinsekretionsrate

Nach Einsetzen des Filters und der Dichtungsringe (A) wurde die Perifusionskammer über den Schlauch blasenfrei mit Krebs-Ringer-Medium und von oben mit den Pankreasinseln befüllt (B). So konnten sie sich auf dem Filter absetzen und wurden während der Umströmung nicht weggespült. (C) Zusammengebaute Kammer mit Zulauf (unten) und Ablauf (oben).

Bei den oft üblichen Sekretionsmessungen mit statischer Inkubation kann nur die Nettomenge an insgesamt sezerniertem Insulin bestimmt werden. Mit dieser Anlage ist es dagegen möglich, kontinuierliche Messungen der Insulinsekretionsrate durchzuführen und so auch kurzfristige Veränderungen zu beobachten.

3.8.2 Versuchsdurchführung

50 frische oder kultivierte Inseln (Kap. 3.5.2a bzw. 3.5.3a) wurden in die blasenfrei mit frischer Krebs-Ringer-Lösung (Kap. 3.4.1b) befüllte Kammer überführt (Abb. 3.16B), die Kammer mit dem zuführenden Schlauch verschlossen und an der Innenwand der Perifusionsanlage fixiert, damit sie möglichst schnell auf 37 °C erwärmt wurde. Die Schlauchpumpe wurde eingeschaltet und die Inseln zunächst gleichmäßig mit reiner KR umströmt. Zu zuvor festgelegten Zeiten wurde anschließend auf die gewünschten Testlösungen gewechselt und definierte Perifusatfraktionen aufgefangen. Aliquots der Fraktionen wurden bis zur Insulingehaltsbestimmung mittels ELISA bei -20 °C gelagert.

3.8.3 Insulin-ELISA

Die Bestimmung des Insulingehaltes erfolgte mit einem ELISA-Kit (Rat Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, SWE). Dieser ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) bedient sich der Sandwich-Technik. Die 96-Well-Microtiterplatten sind mit einem monoklonalen Maus-anti-Insulin-Antikörper, dem „*capture* Antikörper“, beschichtet. An diesen bindet das Insulin aus den Perifusionsfraktionen über ein spezifisches Epitop. Ein weiterer monoklonaler Maus-anti-Insulin-Antikörper, welcher zusätzlich mit einer Peroxidase konjugiert ist, wird hinzugegeben und bindet über ein weiteres Epitop an das Insulin. Dieses „Antikörper-Insulin-Antikörper-Sandwich“ bleibt nach einem Waschschrift, der den überschüssigen Enzym-konjugierten Antikörper entfernt, an der Microtiterplatte gebunden und kann über eine Substratreaktion der Peroxidase detektiert werden. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid wird das zunächst farblose Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) unter Abgabe von zwei Wasserstoffatomen zu seiner blaugefärbten Form oxidiert. Durch Zugabe von verdünnter Schwefelsäure wird die Reaktion abgestoppt und das TMB verfärbt sich gelb.

Die Absorption dieses gelben Endproduktes wurde bei 450 nm mit einem Microtiterplatten-Photometer (Victor2, 1420 multilabel counter, Wallac, Turku, FIN) vermessen. Mit den Proben wurden auch Kalibrierlösungen vermessen, sodass nach Erstellung einer Kalibrierkurve die quantitative Bestimmung des Insulingehaltes möglich war.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Zunächst wurde eine Kalibrierkurve erstellt und aufgrund dieser der Gehalt an Insulin in den einzelnen Fraktionen des Perifusionsversuchs ermittelt. Daraus

konnte letztendlich die Sekretionsrate in Picogramm Insulin pro Insel und Minute berechnet werden.

3.9 Messungen des Adeninnucleotidgehaltes

3.9.1 Der ATP Biolumineszenz Assay

Die Biolumineszenz bezeichnet eine bestimmte Form der Chemilumineszenz, bei der lebende Organismen nach Ablauf einer chemischen Reaktion Energie in Form von Licht abgeben. In sämtlichen Organismen beruht dies auf einer sauerstoffabhängigen Enzym-Substrat-Reaktion, dem Luciferin-Luciferase-System, welches sich in den verschiedenen Spezies jedoch ansonsten stark unterscheidet.

Auf Grundlage der Entdeckung von McElroy (1947), dass die Luciferin-Luciferase-Reaktion des nordamerikanischen Leuchtkäfers (*Firefly*, *Photinus pyralis*) ATP-abhängig ist, entwickelten Strehler and Totter (1952) eine Methode zur quantitativen Bestimmung freien ATPs mithilfe der *Firefly*-Luciferase. Dabei katalysiert die Luciferase in Anwesenheit von Magnesiumionen die Reaktion von ATP und *Firefly*-Luciferin zu Pyrophosphat und Adenylluciferin. Letzteres wird unter Sauerstoffverbrauch und AMP- sowie CO₂-Abspaltung zu einem zunächst angeregten Oxyluciferin umgewandelt, welches relativ schnell unter Lichtemission in seinen Grundzustand übergeht. Bei einem Überschuss an Luciferin und Luciferase ist diese Lichtemission proportional zum verbrauchten ATP.

Zudem ist mit diesem System die parallele Bestimmung des ADP- und AMP-Gehaltes möglich. Wird der Probe eine Kombi aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvatkinase zugegeben, wird das anwesende ADP zu ATP umgewandelt. Bei zusätzlicher Zugabe von Adenylatkinase wird zuvor aus AMP und ATP ADP gebildet, welches dann von der Pyruvatkinase vollständig zu ATP umgewandelt wird. Durch parallele Vermessung von Proben mit beiden Enzymen und PEP, nur mit PEP und Pyruvatkinase sowie unbehandelten Proben, kann durch Differenzbildung der ermittelten ATP-Gehalte der jeweilige Anteil an ADP und AMP berechnet werden (Kimmich, Randles, and Brand 1975).

3.9.2 Versuchsdurchführung

Für die Bestimmung des Adeninnucleotidgehaltes der Inseln unter verschiedenen Bedingungen wurden Gruppen von jeweils 15 frisch isolierten Inseln (Kap. 3.5.2b) mit den jeweiligen Testsubstanzen bzw. -kombinationen in frisch hergestellter KR (Kap. 3.4.1b) statisch inkubiert. In Anlehnung an Detimary, Jonas, and Henquin (1995) wurden sie anschließend mit eiskalter 15 %-iger Trichloressigsäure behandelt, um die Adeninnucleotide aus den Zellen zu extrahieren und störende Proteine zu fällen. Letztere wurden abzentrifugiert und der Überstand zur Entfernung der Trichloressigsäure dreimal mit Diethylether ausgeschüttelt; die Etherphase wurde jeweils verworfen. Die wässrige Phase wurde entweder nur mit Neutralisierpuffer (Kap. 3.4.7) verdünnt oder mit 1,5 mM PEP und 2,3 U/ml Pyruvatkinase bzw. zusätzlich 36 U/ml Adenylatkinase in Neutralisierpuffer gemischt und 40 min bei 37 °C inkubiert.

Der ATP-Gehalt dieser Proben wurde mit einem Adenosin-5'-triphosphat Bioluminescent Assay Kit (FLAA, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) bestimmt. Die luminometrische Messung erfolgte mit einem Microtiterplatten-Photometer (Victor2, 1420 multilabel counter, Wallac, Turku, FIN), der unmittelbar vor der Messung 100 µl des ATP Assay Mix (enthält Luciferin und Luciferase) in das jeweilige zu vermessende Well der Mikrotiterplatte injizierte. Gemessen wurden die freigesetzten Photonen in *counts per second* über einen Zeitraum von 10 sek nach Zugabe der Luciferase. Parallel zu den Proben wurden zur Erstellung von Kalibrierkurven ATP-, ADP- und AMP-Standards vermessen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

3.10 Statistik

Außer bei beispielhaften Einzelregistrierungen sind die Messwerte als Mittelwert \pm SEM angegeben. Wenn nicht anders aufgeführt, erfolgte die statistische Auswertung mithilfe des zweiseitigen, ungepaarten t-Tests. Bei $p < 0,05$ gilt die statistische Signifikanz als gegeben.

Für eine bessere Übersichtlichkeit wird die Streuung in den Abbildungen nur in einer Richtung dargestellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Einfluss hoher Kaliumkonzentrationen auf das Calciumsignal der β -Zelle

4.1.1 Membranpotentialmessungen: Effekte verschiedener Calciumkanalblocker nach Kaliumdepolarisation

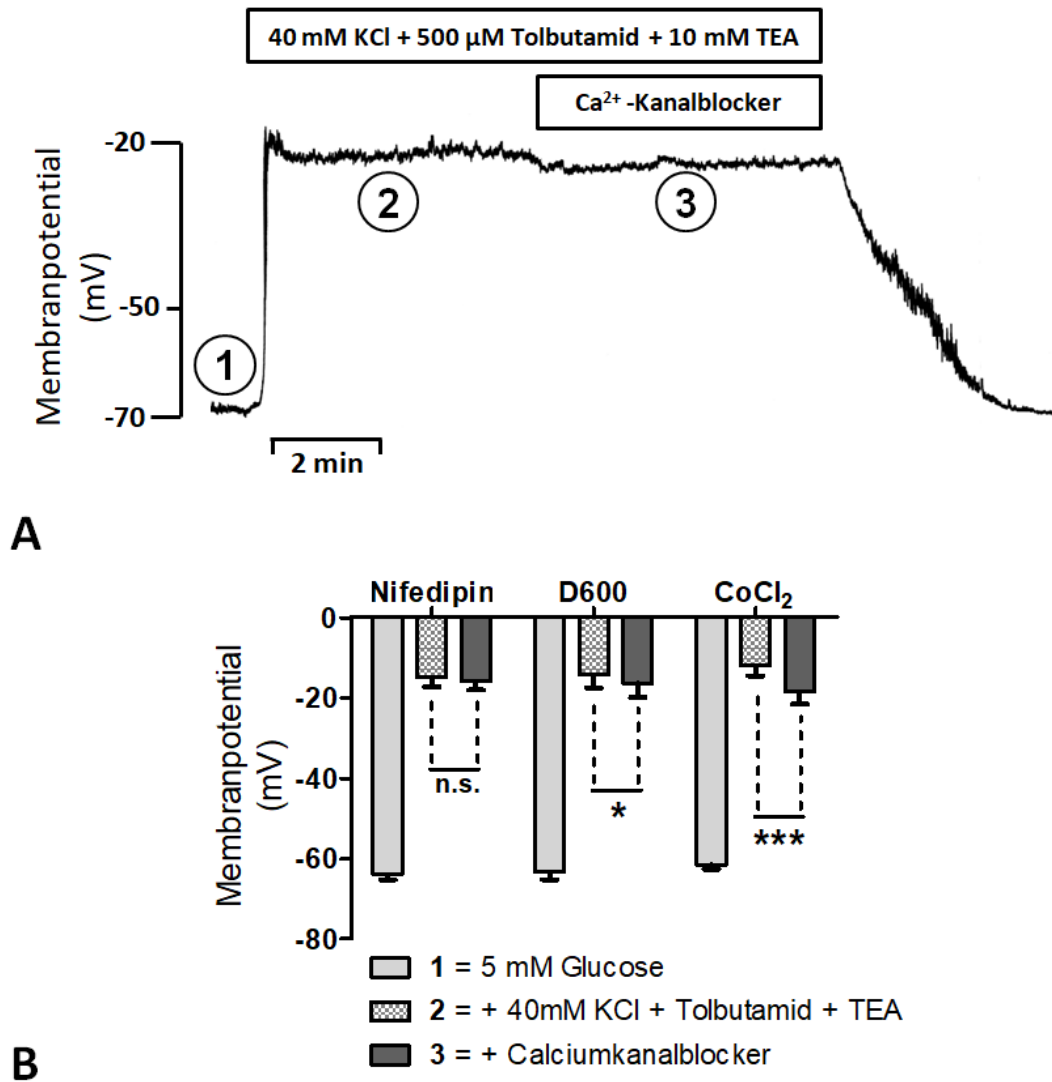


Abbildung 4.1: Effekte der Calciumkanalblocker Nifedipin, D600 und CoCl₂ auf das Membranpotential einzelner β -Zellen nach Depolarisation mit 40 mM KCl, Tolbutamid und TEA. Membranpotentialmessungen an einzelnen, kultivierten β -Zellen. Diese wurden mit 5 mM Glucose und den Substanzen wie angegeben umströmt. **(A)** Darstellung des allgemeinen Versuchsprotokolls, Registrierung repräsentativ für 7 Versuche mit Nifedipin. **(B)** Mittelwerte der gemessenen Membranpotentiale zu den in **A** markierten Versuchsbedingungen, MW \pm SEM von 7 (10 μ M Nifedipin), 6 (50 μ M D600) und 5 (2,5 mM CoCl₂) Versuchen (***: $p = 0,0004$, *: $p = 0,029$, n.s.: $p = 0,103$; zweiseitiger, gepaarter t-Test).

Das Membranpotential einzelner, kultivierter β -Zellen wurde im *Current Clamp*-Modus und in der *perforated-patch* Konfiguration der Patch-Clamp-Technik vermessen. Nachdem sich ein stabiles Ruhemembranpotential eingestellt hatte ($-63,1 \pm 0,8$ mV, $n = 18$) wurde auf ein Perifusionsmedium gewechselt, welches 40 mM KCl, 500 μ M Tolbutamid und 10 mM TEA enthielt. Dies führte zu einer starken Depolarisation der β -Zellmembran um 49 mV auf ein Plateau von $13,9 \pm 1,5$ mV. Um den Beitrag des Calciumeinstroms zur Kaliumdepolarisation abzuschätzen, wurden die Calciumkanalblocker Nifedipin (10 μ M, $n = 7$), D600 (50 μ M, $n = 6$) oder Cobaltchlorid (2,5 mM, $n = 5$) dem Medium hinzugefügt. D600 ($\Delta\psi = -2,1 \pm 1,7$ mV) und CoCl_2 ($\Delta\psi = -6,5 \pm 1,4$ mV) führten zu einer schwachen, aber signifikanten Repolarisation (Abb. 4.1B). Dagegen hatte der L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker Nifedipin unter diesen Bedingungen keinen signifikanten Effekt auf das Membranpotential ($\Delta\psi = -0,9 \pm 1,2$ mV).

4.1.2 *Mikrofluorimetrische Messungen der freien, cytosolischen Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$: Deutliche Hemmung des Kalium-induzierten Calciumeinstroms durch Calciumkanalblocker*

Zur Kontrolle, ob die unterschiedlich starken Effekte der Calciumkanalblocker auf das Membranpotential sich unter diesen Bedingungen auch als unterschiedliche Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigen, wurden mikrofluorimetrische Messungen durchgeführt. Zunächst wurde der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Anwesenheit von 500 μ M Tolbutamid und 10 mM TEA (Verdopplung der Fluo-4 Fluoreszenz) und anschließend die Effekte der sukzessiv erhöhten Kaliumkonzentration beobachtet (Abb. 4.2A). In Anwesenheit von 15 mM KCl begann das erneut leicht gestiegene Fluoreszenzsignal zusätzlich zu oszillieren. Die Erhöhung der Kaliumkonzentration auf 40 mM unterdrückte diese Oszillation und führte zu einer weiteren Zunahme der Fluoreszenzintensität auf etwa dasselbe Niveau wie durch die Kaliumkanalblocker zu Beginn. Sowohl 2,5 mM CoCl_2 als auch 10 μ M Nifedipin (je $n = 3$) senkten bei bestehender Anwesenheit der vorangegangenen Substanzen die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf prästimulatorische Werte (Abb. 4.2B).

Auffällig war bei diesen Messungen, dass die Fluoreszenz durch Zugabe der Testsubstanzen zum Medium nach jeweils 90–150 s ein Maximum erreichte, um anschließend wieder auf ein niedrigeres aber nach weiteren 5 min stabiles Niveau abzufallen (s. Abb. 4.4D für Tolbutamid).

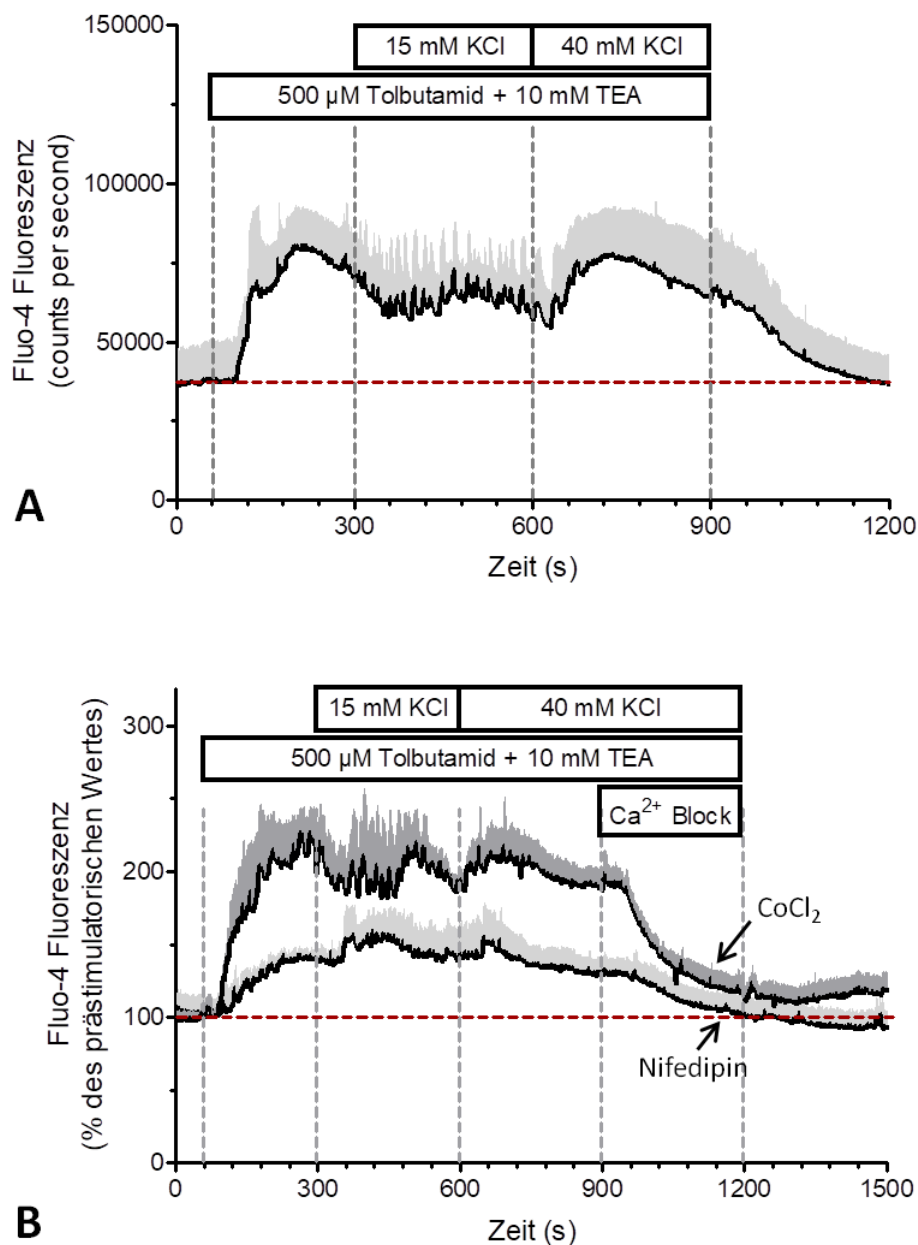


Abbildung 4.2: Effekt von Nifedipin und CoCl_2 auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Anwesenheit von 40 mM KCl, Tolbutamid und TEA Während der Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einzelner, kultivierter β -Zellen mit Fluo-4 wurden diese mit 5 mM Glucose und den angegebenen Substanzen perfundiert. **(A)** Kontrollversuch ohne Zugabe eines Calciumkanalblockers, $\text{MW} \pm \text{SEM}$ von 4 Versuchen. **(B)** Vergleich der Experimente mit 2,5 mM CoCl_2 und 10 μ M Nifedipin nach Normalisierung auf den Wert vor Zugabe der Testsubstanzen, $\text{MW} \pm \text{SEM}$ von je 3 Versuchen.

Die jeweils um etwa eine Minute verzögert einsetzende Reaktion ist der Tatsache geschuldet, dass die Markierungen den Zeitpunkt des beginnenden Lösungswechsels anzeigen, es im Anschluss aber noch einer gewissen Zeit bedarf, bis das Medium im Zellbad vollständig ausgetauscht ist.

Die gemessenen Anstiege der Fluoreszenzintensität schwankten unter gleichen Bedingungen von Zelle zu Zelle recht stark, was vermutlich u.a. an der variierenden Zellgröße sowie Hintergrundfluoreszenz lag. Dadurch kam es zu einer relativ großen Streuung der Mittelwerte und zu der im Vergleich zu der mit CoCl_2 flacher ausfallenden Kurve bei Nifedipinzugabe.

4.1.3 *Simultane Messungen des Membranpotentials und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$: Wird unter simultanen Bedingungen das gleiche beobachtet?*

Die dargestellten und z.T. widersprüchlichen Ergebnisse sollten in einer simultanen Versuchsanordnung überprüft werden. Dazu wurde parallel zur Membranpotentialmessung das Fluo-4 Signal aufgezeichnet (repräsentative Messung, Abb. 4.3).

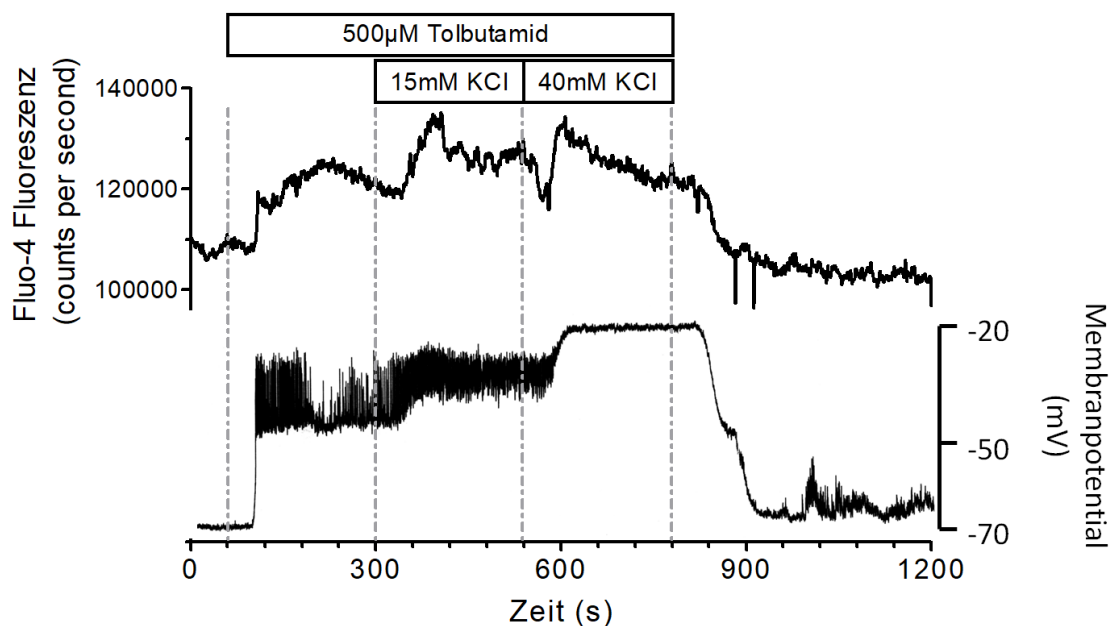


Abbildung 4.3: Simultane Messung der Effekte von Tolbutamid und 15 bzw. 40 mM KCl auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und Membranpotential Während der simultan aufgenommenen Registrierung des Membranpotentials (untere Spur) im *Current Clamp*-Modus und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (obere Spur) einzelner, kultivierter β -Zellen mit Fluo-4 wurden diese mit 5 mM Glucose und den angegebenen Substanzen perfundiert. Registrierung repräsentativ für 4 Experimente.

Bei diesen Versuchen wurde mit einer etwas vereinfachten Variante des Versuchsprotokolls aus Abb. 4.2A begonnen (kein TEA). Ohne die Anwesenheit von

TEA löste Tolbutamid bei der Membranpotentialmessung zunächst klassische Aktionspotentiale aus. 15 mM KCl erhöhte das Plateaupotential bei einem Fortbestehen der Aktionspotentiale mit verringerter Amplitude, während die weitere Erhöhung der Kaliumkonzentration auf 40 mM zu einer erneuten Anhebung des Potentials auf ein Niveau von etwa -20 mV führte. Dadurch wurden die Aktionspotentiale vollständig überlagert und waren nicht mehr identifizierbar. Auch die $[Ca^{2+}]_i$ stieg mit jeder Zugabe an.

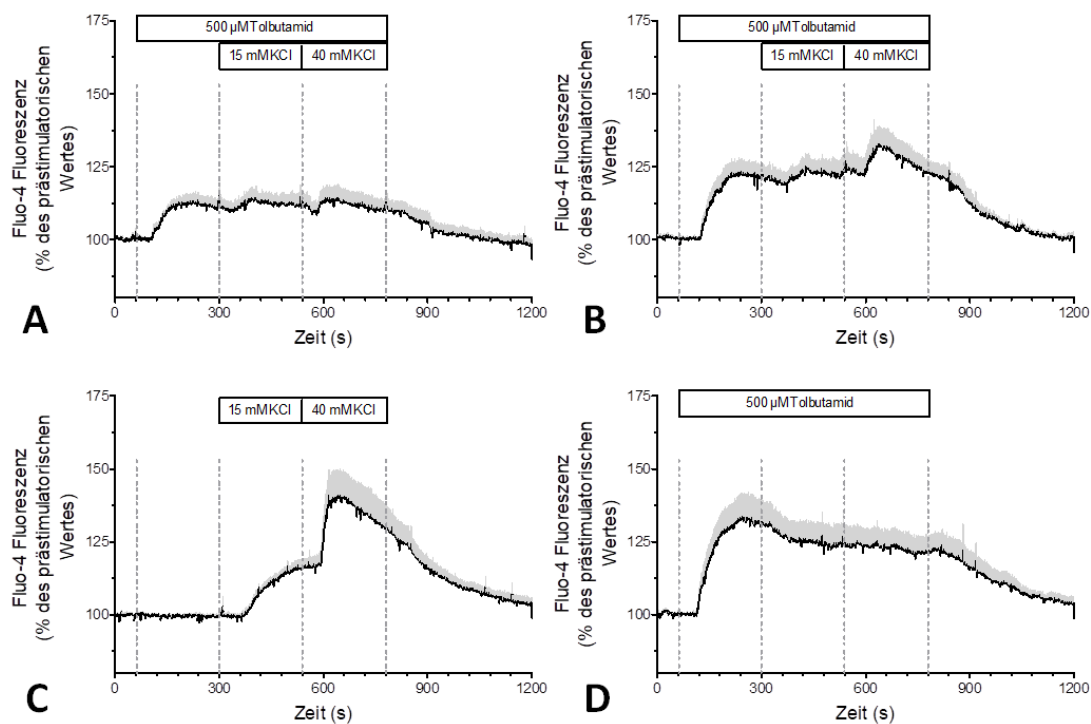


Abbildung 4.4: Beeinflussung der Calciummessung bei simultaner Messung des Membranpotentials im *Current Clamp*-Modus Darstellung der $[Ca^{2+}]_i$ der Versuche aus Abb. 4.3, MW \pm SEM von 4 Versuchen (A). Calciummessungen ohne simultane Messung des Membranpotentials mit demselben Protokoll (B) und als Kontrollversuche ohne Tolbutamid (C) bzw. ohne Erhöhung der Kaliumkonzentration (D), MW \pm SEM von je 5 Versuchen.

Abb. 4.4A stellt die Mittelwerte der simultan gemessenen Fluo-4 Fluoreszenzen dar ($n = 4$), Abb. 4.4B zeigt im Vergleich die Reaktion, wenn die β -Zelle nicht gleichzeitig im *Current Clamp* gehalten wird ($n = 5$). Der Anstieg war hier z.T. mehr als doppelt so stark ausgeprägt. Zudem wurden nicht simultane Kontrollversuche durchgeführt, in denen entweder nur die Kaliumkonzentration erhöht (4.4C) oder nur mit Tolbutamid umströmt wurde (4.4D, jeweils $n = 5$). Die beobachteten Effekte von KCl oder

Tolbutamid alleine waren jeweils deutlich stärker ausgeprägt als bei Kombination der Substanzen. Außerdem zeigt Abb. 4.4D das Absinken der Fluoreszenz auf ein Plateau, welches sogar weiterhin ein leichtes Gefälle aufweist.

4.1.4 Membranpotentialmessungen: Veränderung des Aktionspotentialmusters unter Einfluss hoher Kaliumkonzentrationen und Vergleich mit dem Calciumkanalöffner (\pm)-Bay K8644

Die Frage, in welchem Ausmaß ein Calciumeinstrom in den Mechanismen der stark insulinotropen Wirkung hoher Kaliumkonzentrationen involviert ist, sollte daraufhin auf andere Weise beantwortet werden.

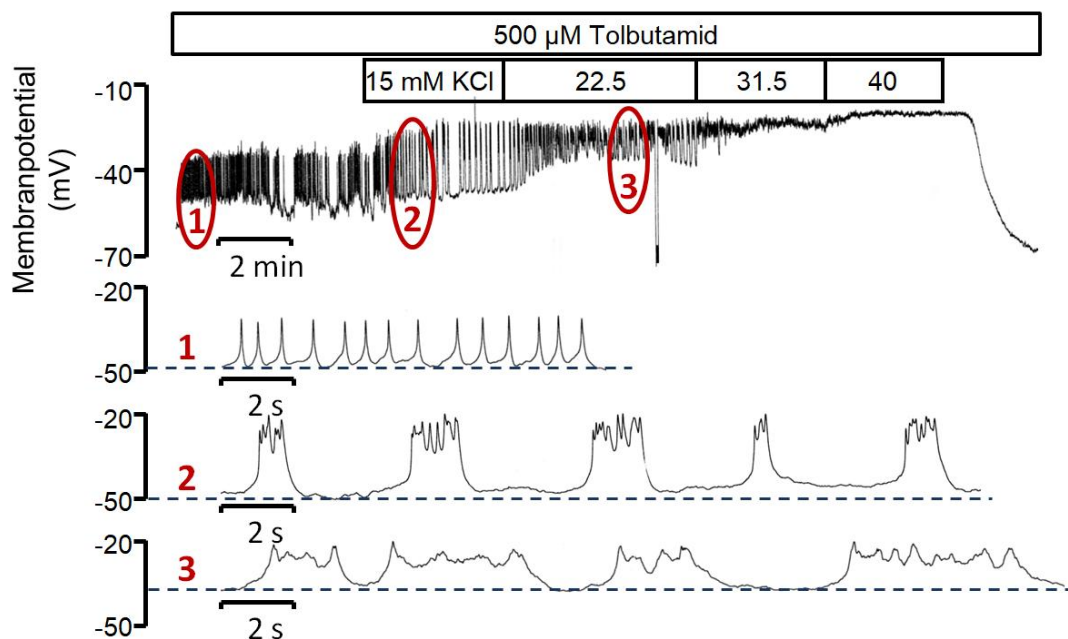


Abbildung 4.5: Veränderung der Tolbutamid-induzierten Aktionspotentiale durch steigende extrazelluläre Kaliumkonzentrationen Messung des Membranpotentials einzelner, kultivierter β -Zellen bei basaler Glucose (5 mM). In Anwesenheit von Tolbutamid wurde mit KCl in steigender Konzentration umströmt. Zur Veranschaulichung der veränderten Aktionspotentialform (Verbreiterung, Verschmelzung, Amplitude) wurden die markierten Ausschnitte mit expandierter Zeitskala dargestellt, Messung repräsentativ für 4 Versuche.

Bei Abb. 4.5 handelt es sich wiederum um eine Messung des Membranpotentials einzelner β -Zellen. Dem Tolbutamid, welches klassische Aktionspotentiale (AP) auslöste, wurde Kalium in vier sukzessiv steigenden Konzentrationen (15, 22,5, 31,5

und 40 mM) hinzugefügt. Der Gesamtdarstellung (obere Spur) kann man v.a. die schrittweise Anhebung des Plateaupotentials und die Veränderung der AP-Amplitude entnehmen. Im Gegensatz zur Messung in Abb. 4.3 bewirkte 15 mM KCl hier zunächst eine Vergrößerung der AP-Amplitude, welche mit höheren Kaliumkonzentrationen zunehmend verringert wurde. Durch die Darstellung der Ausschnitte 1 und 2 mit expandierter Zeitachse ist erkennbar, dass die einfachen, Tolbutamid-induzierten Aktionspotentiale unter Einfluss von 15 mM Kalium verbreitert wurden bzw. verschmolzen, während es dazwischen zu verlängerten Ruhephasen auf dem Niveau des Plateaupotentials kam. Die Verminderung der AP-Amplitude, wie sie in Abb. 4.3 bei 15 mM KCl zu sehen ist, wird in diesem Versuch bei 22,5 mM KCl erkennbar. Nun erschienen die Aktionspotentiale eher wie ein langsamer Wechsel zwischen hohem und niedrigerem Plateau. Bei 31,5 mM blieb nur noch ein sehr unruhiges Signal um -23 mV ohne identifizierbare Aktionspotentiale und mit 40 mM Kalium wurde wie in den Abb. 4.1+3 ein ruhiges Plateau bei -20 mV erreicht.

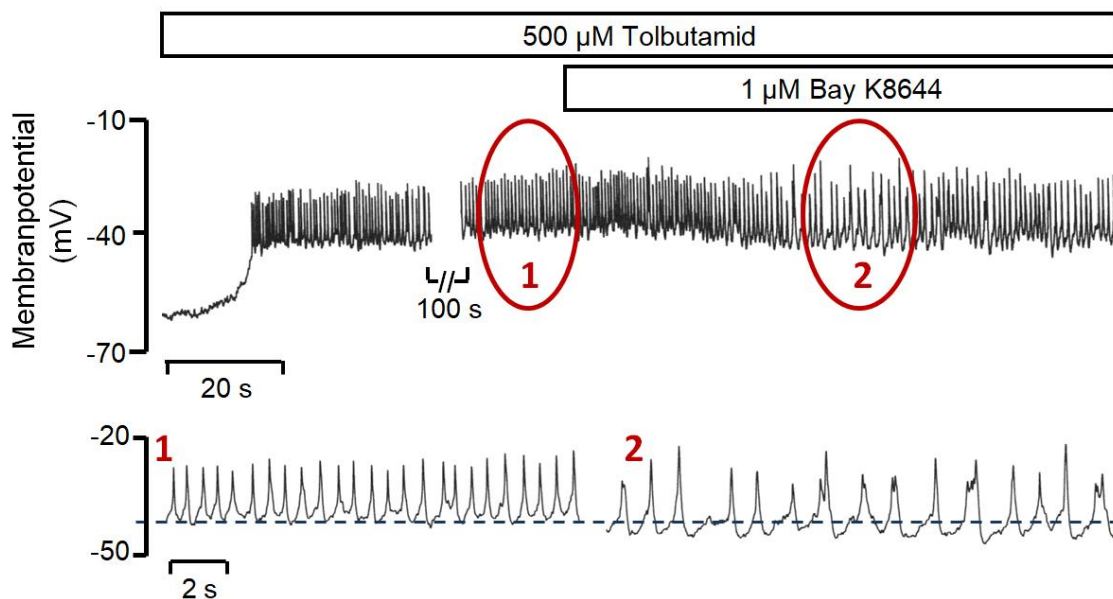


Abbildung 4.6: Veränderung der Tolbutamid-induzierten Aktionspotentiale durch (±)-Bay K8644 Das Membranpotential einzelner, kultivierter β -Zellen wurde bei basaler Glucose (5 mM) vermessen. In Anwesenheit von Tolbutamid wurde mit racemischem Bay K8644 umströmt. Die markierten Ausschnitte wurden mit expandierter Zeitskala dargestellt, Messung repräsentativ für je 6 Versuche.

Die AP-Verbreiterung bei 15 mM KCl erinnerte an den Effekt des L-Typ Ca^{2+} -Kanalöffners (±)-Bay K8644 (Bay K). Zum direkten Vergleich wurden Messungen des β -Zellmembranpotentials mit Tolbutamid (500 µM) und Bay K (1 µM) unter ansonsten

gleichen Bedingungen wie in Abb. 4.5 durchgeführt (Abb. 4.6). Wenn auch weniger stark ausgeprägt, so hatte auch die Zugabe von Bay K eine Verbreiterung und Verschmelzung der Aktionspotentiale zur Folge (bis zu 3 Peakspitzen auf einem AP). Zudem kam es hier zu einer verstärkten Repolarisation mit einem 4 mV negativeren Plateau. Von diesem ausgehend depolarisierte die Membran zunächst nur langsam bis zu dem Niveau der Tolbutamid-AP, woran sich dann wiederum der schnelle Aufstrich eines klassischen Aktionspotentials anschloss.

4.1.5 Membranstrommessungen: Gibt es einen direkten Einfluss auf die Aktivität spannungsgesteuerter Calciumkanäle (VDCC)?

Aufgrund dieser ähnlichen Effekte hoher extrazellulärer Kaliumkonzentrationen und von Bay K auf die durch Ca^{2+} -Einstrom bewirkten Aktionspotentiale wurde in *Voltage Clamp*-Versuchen und unter Bedingungen, die störende Kaliumströme unterdrücken, die Beeinflussung der Funktion spannungsgesteuerter Calciumkanäle einzelner β -Zellen untersucht.

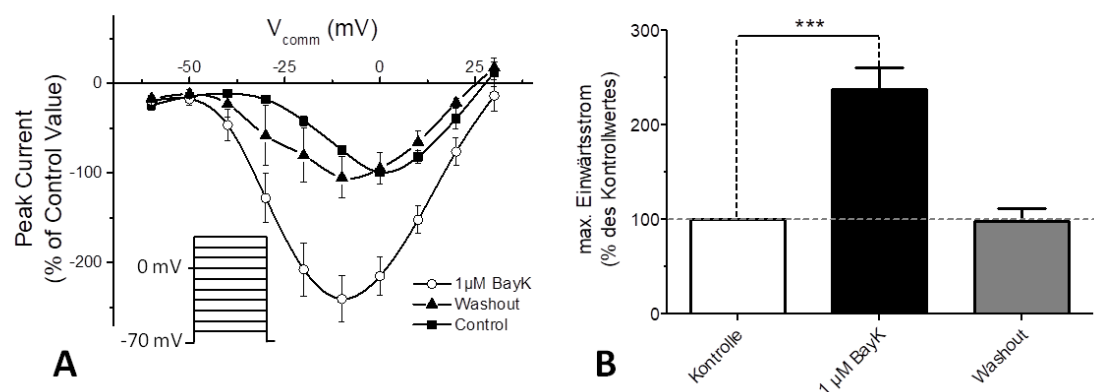


Abbildung 4.7: Effekt des direkten Calciumkanalöffners Bay K auf die Aktivität von VDCC Einzelne, kultivierte β -Zellen wurden im *Voltage Clamp*-Modus ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV in 10 mV Schritten bis zu einem Kommandopotential von +30 mV depolarisiert (kleine Einfügung in **A**, s. auch Kap. 3.6.2b und 3.6.4c). **(A)** Stromspannungskennlinie. Der jeweils gemessene Spitzeneinwärtsstrom wurde auf den Maximalwert vor Zugabe von Bay K normalisiert und in Abhängigkeit von dem jeweiligen Kommandopotential aufgetragen (zugehörige I/V-Kurve mit Stromdichte in Kap. 3.6.4c, Abb. 3.9C). **(B)** Prozentualer Anstieg der maximalen Calciumeinwärtsströme bei -10 mV und Reversibilität nach Auswaschen des Calciumkanalöffners. MW \pm SEM von 7 Versuchen (***: $p = 0,0009$; zweiseitiger, gepaarter t-Test).

Auch bei diesen Versuchen schwankten bereits die Werte der Stromdichte unter Kontrollbedingungen recht stark ($-4,2 \pm 1,2$ pA/pF (Bay K, $n = 7$) vs. $-8,3 \pm 1,6$ pA/pF (KCl, $n = 9$) bei 0 mV, $p = 0,0695$), sodass sie für die bessere Vergleichbarkeit anschließend auf den prästimulatorischen Kontrollwert normalisiert wurden (Abb. 4.7A + 4.8B). Nach Zugabe von Bay K zum Perifusionsmedium kam es zu einem deutlichen Anstieg des Calciumeinstroms (238 ± 23 %, $n = 7$). Dieser Effekt war nach Auswaschen vollständig reversibel, während der Grundeinwärtsstrom erhalten blieb (Abb. 4.7B).

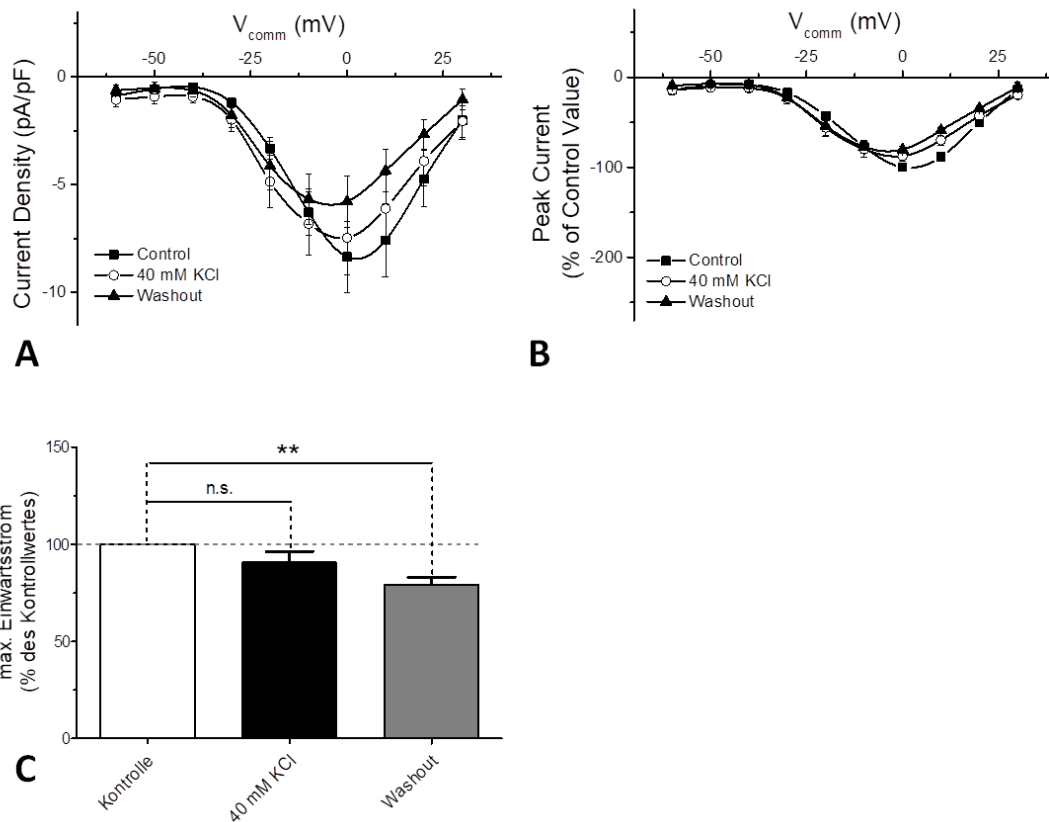


Abbildung 4.8: Kein direkter Effekt von 40 mM Kalium auf die Aktivität der VDCC Der Effekt von 40 mM KCl auf die VDCC einzelner, kultivierter β -Zellen wurde unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 4.6 untersucht. **(A+B)** Stromspannungskennlinien. Spitzeneinwärtsströme als Stromdichte **(A)** bzw. normalisiert auf den Maximalwert vor Zugabe des Kaliumchlorids **(B)** aufgetragen als Funktion des jeweiligen Kommandopotentials. **(C)** Veränderung des maximalen Calciumeinstroms bei 0 mV. MW \pm SEM von 9 Versuchen (**: $p = 0,0011$, n.s.: $p = 0,1364$; zweiseitiger, gepaarter t-Test).

40 mM Kalium dagegen änderte den Calciumstrom nicht signifikant (91 ± 6 %, $n = 9$) (Abb. 4.8C). Eine leichte Abnahme war zwar über den gesamten Versuchszeitraum zu

beobachten und nach Auswaschen auch signifikant ($79 \pm 4 \%$), dies ist aber vermutlich mit dem *Run Down* des Calciumstroms zu erklären. Allerdings wurde hier ein stark variierendes Verhalten der verschiedenen β -Zellen beobachtet (Abb. 4.9): Während bei drei von neun untersuchten Zellen über den gesamten Zeitraum der Kaliumzufuhr keine Veränderung im Einwärtsstrom zu erkennen war ($97 \pm 2 \%$), stieg er bei weiteren vier Versuchen leicht an ($118 \pm 6 \%$), davon dreimal transient und einmal dauerhaft. Mit einem Wert von $p = 0,0519$ war dieser Anstieg jedoch nicht signifikant. Bei zwei Messungen nahm der Calciumeinstrom sogar ab (65 bzw. 83%) mit Wiederanstieg bei Auswaschen (79 bzw. 94%).

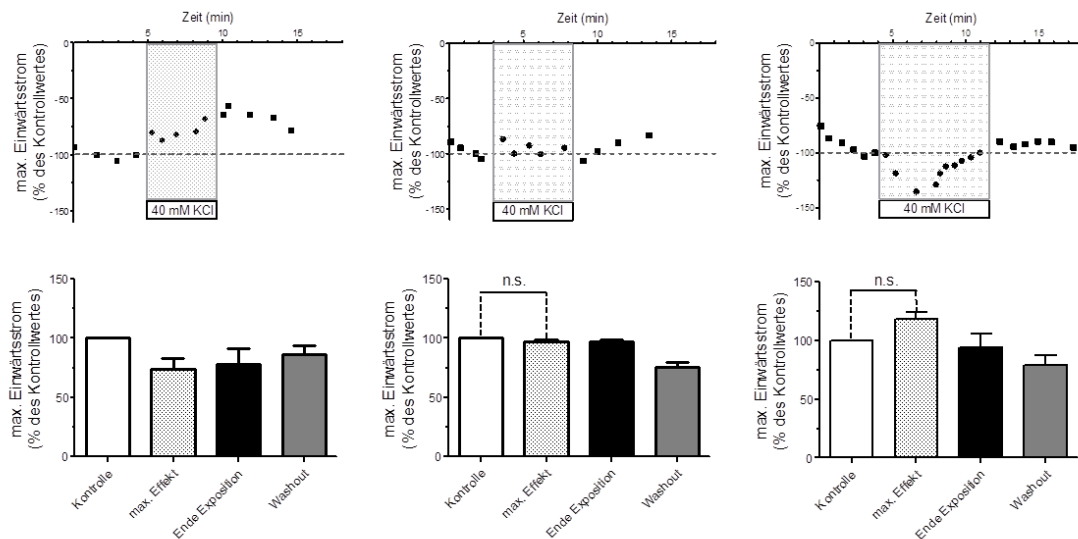


Abbildung 4.9: Differenzierung der Effekte von 40 mM Kalium Die 9 Versuche aus Abb. 4.8 zeigten drei unterschiedliche Reaktionen auf das Kalium, welche in der oberen Reihe anhand von beispielhaften Versuchsverläufen dargestellt sind. Für die Säulendiagramme wurden diese Effekte quantitativ ausgewertet. Bei 2 der 9 Versuche sank der Einwärtsstrom bei Zugabe des Kaliums leicht ab, bei einem davon nur vorübergehend (**links**). Bei 3 der 9 Versuche führte das Kalium zu keiner Veränderung des Calciumstroms (**Mitte**). Bei 4 weiteren kam es zu einem leichten Anstieg, der aber wiederum bei 3 dieser 4 Versuche nur transient war (**rechts**), MW \pm SEM von 2, 3 bzw. 4 Versuchen (n.s.: $p = 0,2352$ bzw. $p = 0,0519$; zweiseitiger, gepaarter t-Test).

4.2 Untersuchungen zu den Effekten von Mefloquin auf Membranpotential, Calciumeinstrom und Insulinsekretion

Da in der Literatur vermehrt die mögliche Rolle von Hemichannels in der Regulation des Membranpotentials und des Calciumeinstroms von β -Zellen berichtet wird, war es wichtig, die Eignung des pharmakologischen Hemmstoffs zu prüfen. Als Hemmstoff von Hemichannels wird vorzugsweise das Antimalariamittel Mefloquin verwendet.

4.2.1 Membranpotentialmessungen: Mefloquin depolarisiert die β -Zellmembran

Zunächst wurde in *Current Clamp*-Versuchen die Wirkung von Mefloquin (10–50 μ M) auf das β -Zellmembranpotential untersucht (Abb. 4.10).

In diesem Konzentrationsbereich depolarisierte Mefloquin die β -Zellmembran um $12,6 \pm 2,8$ mV (10 μ M, $n = 6$), $19,1 \pm 3,7$ mV (25 μ M, $n = 5$) bzw. $32,8 \pm 4,7$ mV (50 μ M, $n = 4$). Damit war der Effekt von 25 und 50 μ M Mefloquin nicht signifikant verschieden von dem von Tolbutamid in einer maximal effektiven Konzentration ($23,9 \pm 0,8$ mV bis zum Plateaupotential, $n = 13$). Das mit Mefloquin erreichte Membranpotential war zwar sehr unruhig, im Gegensatz zu Tolbutamid wurden dennoch keine Aktionspotentiale sichtbar. Zudem setzte die Depolarisation mit Mefloquin im Vergleich zu Tolbutamid verzögert ein. Während Tolbutamid an diesem Set-up bereits nach einer halben Minute seine volle Wirkung entfaltet hatte, dauerte es bis zu 4 min, bis die Depolarisation unter Mefloquin einsetzte und weitere 5–7 min bis ein konstantes Plateau erreicht wurde (Abb. 4.10C).

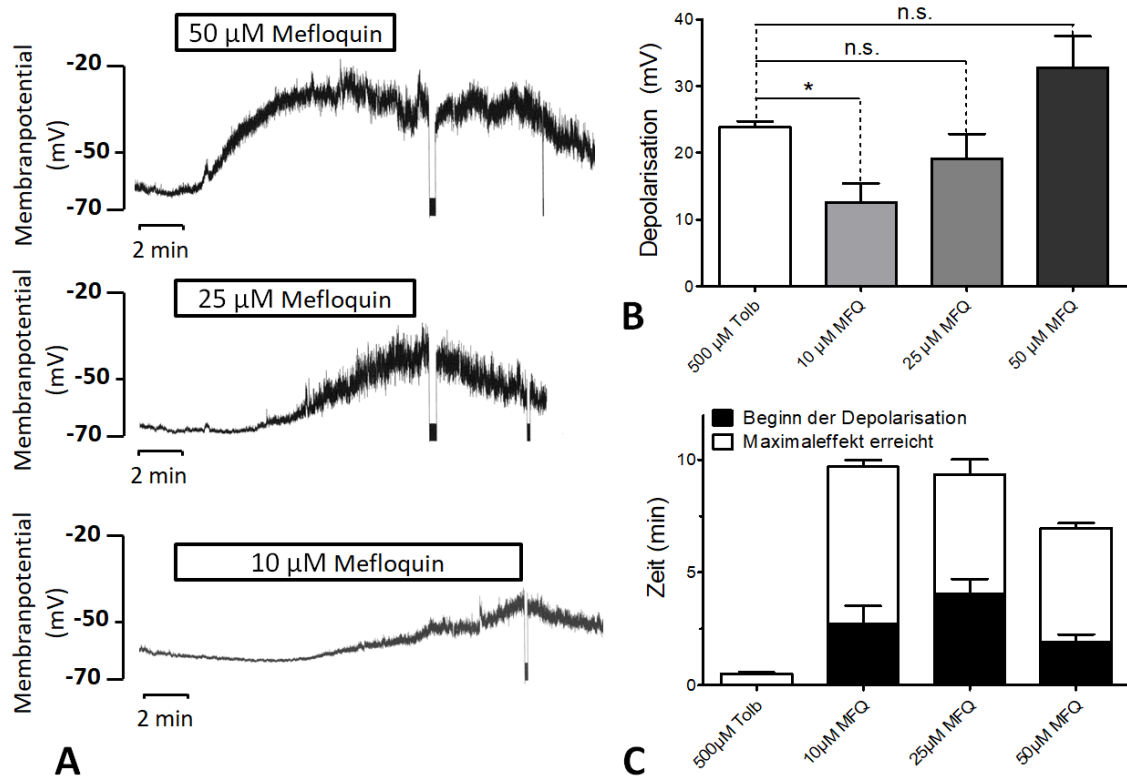


Abbildung 4.10: Depolarisation der β -Zellplasmamembran durch Mefloquin und Tolbutamid (A) *Current Clamp*-Messungen an einzelnen, kultivierten β -Zellen. Diese wurden mit basaler Glucose (5 mM) und Mefloquin (MFQ) in Konzentrationen von 10 bis 50 μ M perfundiert. Registrierungen repräsentativ für die Versuche, die in (B+C) ausgewertet wurden. (B) Ausmaß der Depolarisation mit 10–50 μ M MFQ im Vergleich zu 500 μ M Tolbutamid. (C) Kinetik der K_{ATP} -Kanalblockade durch MFQ und Tolbutamid. MW \pm SEM von 13 (Tolbutamid), 4 (50 μ M), 5 (25 μ M) bzw. 6 (10 μ M MFQ) Versuchen (*: $p = 0,0186$, n.s.: $p = 0,2792$ bzw. $0,1592$; nach Welch-Korrektur für ungleiche Standardabweichungen).

4.2.2 Membranpotentialmessungen: Mefloquin unterdrückt Aktionspotentiale

Da das Ausmaß der Depolarisation eigentlich zur Entstehung von Aktionspotentialen hätte führen müssen, wurde die Wirkung von Mefloquin auf präexistente Aktionspotentiale geprüft. Es zeigte sich, dass Mefloquin (10, 25 und 50 μ M) die durch Tolbutamid induzierten Aktionspotentiale vollständig unterdrückte (Abb. 4.11, oben + Mitte, 25 μ M nicht abgebildet); ein Effekt, der genauso bei der Kombination von Tolbutamid und dem Ca^{2+} -Kanalblocker Nisoldipin (1 μ M) beobachtet werden konnte (Abb. 4.11, unten).

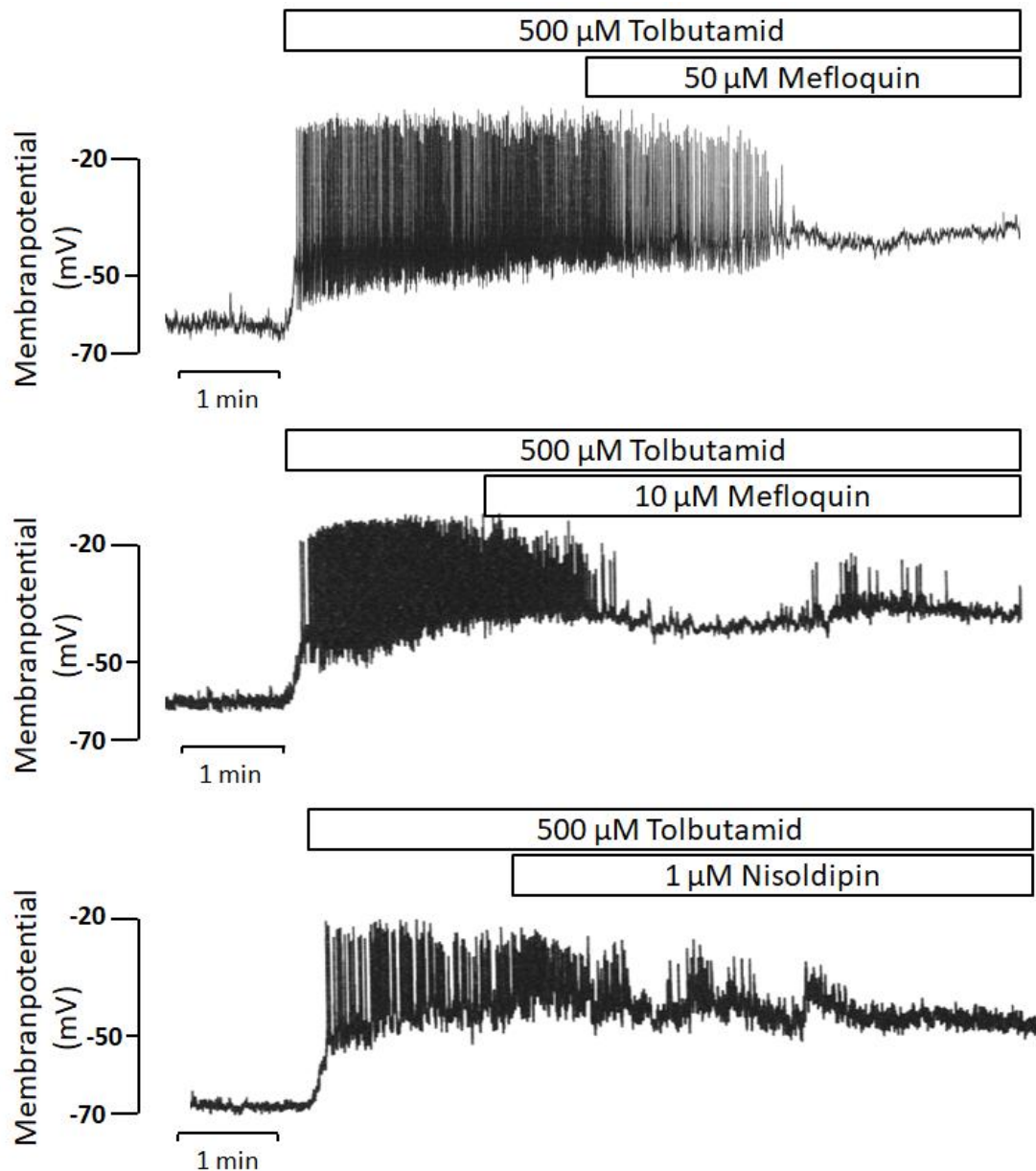


Abbildung 4.11: Mefloquin hemmt Tolbutamid-induzierte Aktionspotentiale Bei basaler Glucose (5 mM) wurde das Membranpotential einzelner, kultivierter β -Zellen vermessen. Nach Erscheinen stabiler, Tolbutamid-induzierter Aktionspotentiale wurde MFQ (50 + 10 μ M, **oben + Mitte**) oder Nisoldipin (NIS, 1 μ M, **unten**) dazugegeben. Registrierungen repräsentativ für je 3 (10 + 50 μ M MFQ) bzw. 4 (NIS) Versuche.

Im Gegenversuch wurde nach einem Funktionstest der jeweiligen β -Zelle mit Tolbutamid (erste Umströmung) mit Mefloquin und Tolbutamid in umgekehrter Reihenfolge umströmt (Abb. 4.12). In Anwesenheit von Mefloquin blieben die Tolbutamid-induzierten calciumgetragenen Aktionspotentiale aus, was im Kontrollversuch ohne Mefloquin (unten) nicht der Fall war.

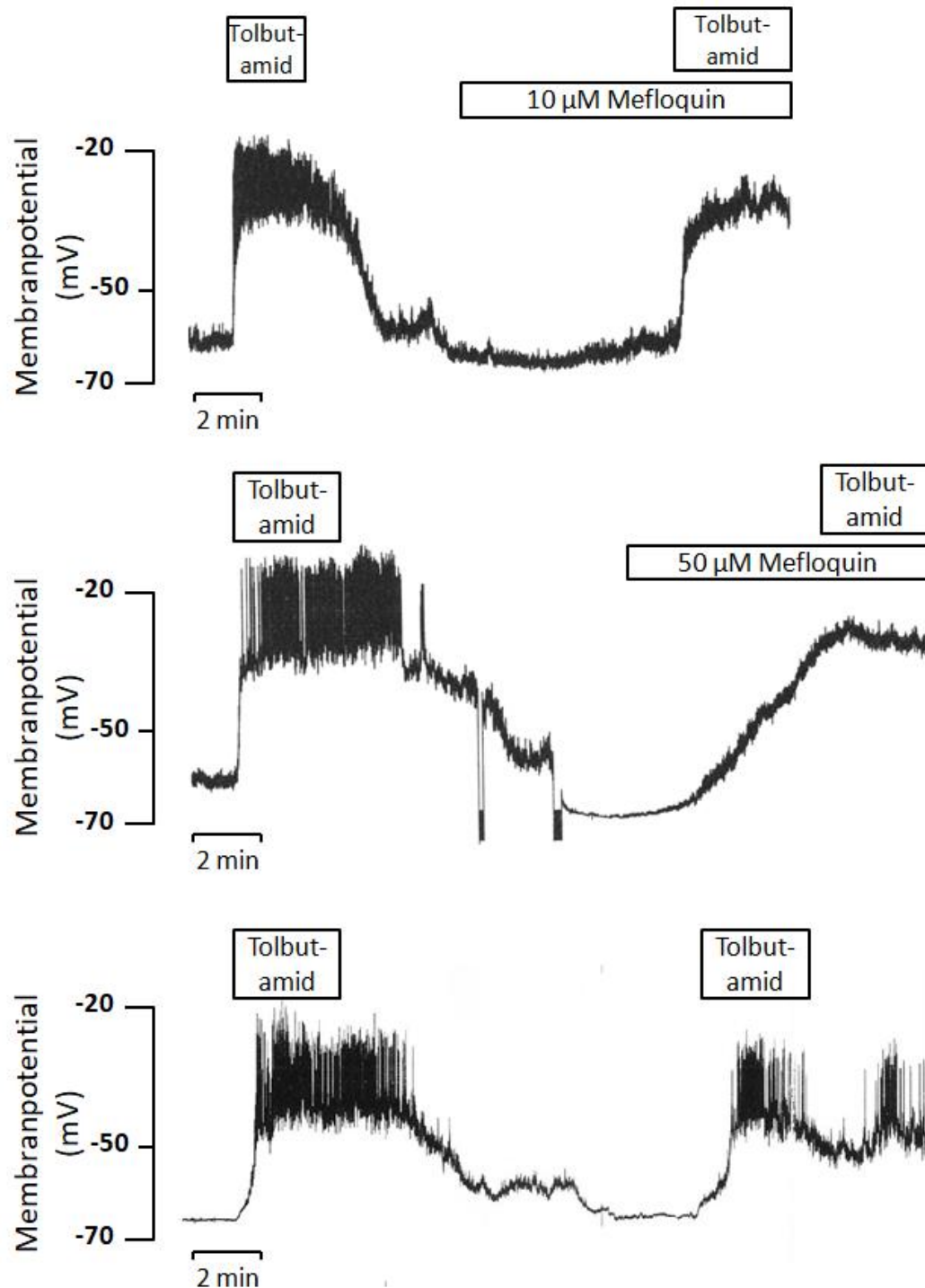


Abbildung 4.12: Mefloquin verhindert das Entstehen Tolbutamid-induzierter Aktionspotentiale Bei basaler Glucose (5 mM) wurde das Membranpotential einzelner, kultivierter β -Zellen vermessen. **(Oben + Mitte)** Nachdem zunächst die Entstehung von AP in der jeweiligen Zelle mit Tolbutamid belegt worden war (erste Zufuhr), wurde die Umströmung mit Tolbutamid in Gegenwart von MFQ (10 bzw. 50 μ M) wiederholt. **(Unten)** Kontrollversuch ohne MFQ. Registrierungen repräsentativ für je 3 Versuche.

4.2.3 Membranstrommessungen: Mefloquin hemmt spannungsabhängige Calciumkanäle

Diese Beobachtungen legten eine hemmende Wirkung von Mefloquin auf den Ca^{2+} -Einstrom nahe. Daraufhin sollte ein möglicher direkter Einfluss auf die Funktion von VDCC untersucht werden. Dafür wurden einzelne β -Zellen im *Voltage Clamp* stimuliert und die resultierenden Ströme aufgezeichnet. Dabei wurde der Effekt von Mefloquin in einem Konzentrationsbereich von 5–50 μM mit dem von Nisoldipin in maximal effektiver Konzentration (1 μM) verglichen. Sowohl Mefloquin als auch Nisoldipin reduzierten den depolarisationsinduzierten Calciumstrom deutlich (Abb. 4.13+14).

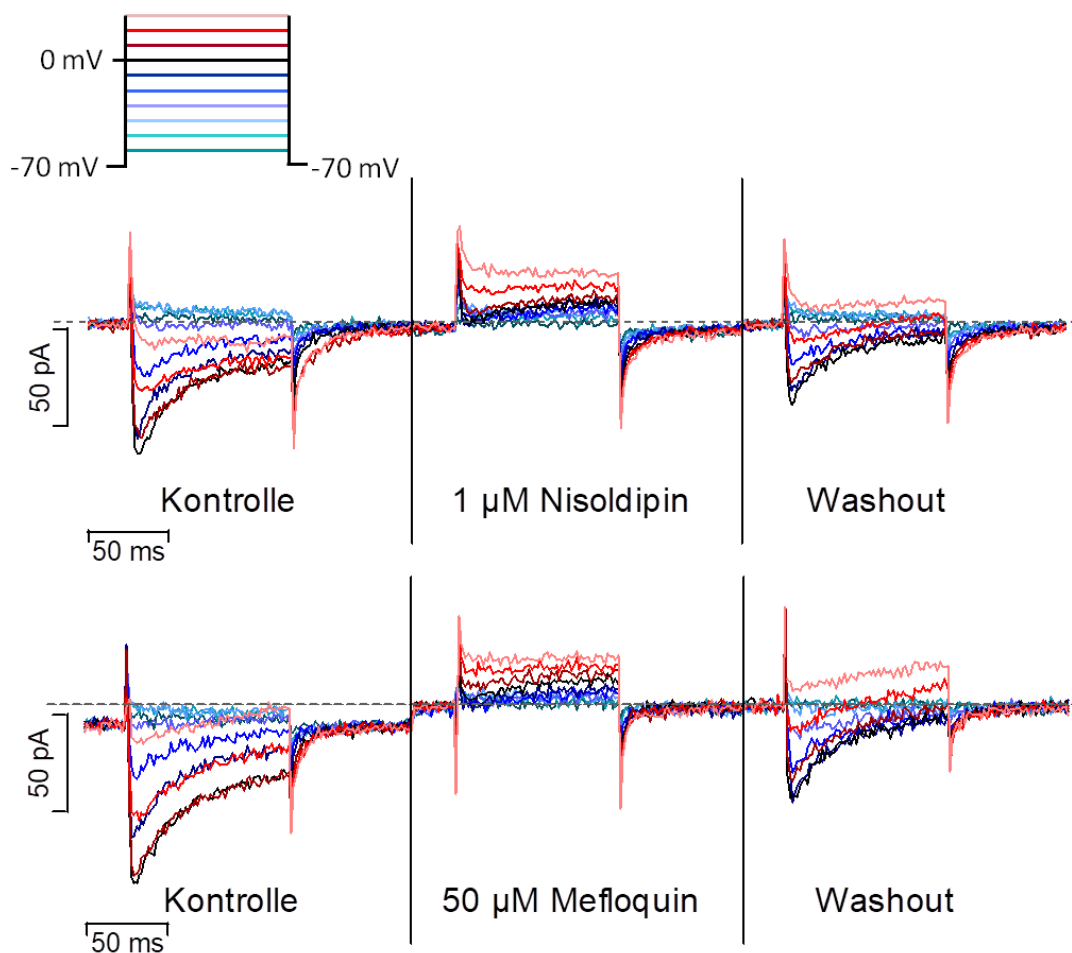


Abbildung 4.13: Hemmung der VDCC durch Mefloquin und Nisoldipin - Stromkurven Einzelne, kultivierte β -Zellen wurden wie in Kap. 3.6.2b dargestellt im *Voltage Clamp* ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV stimuliert (Stimulationsprotokoll oben links) und der Stromfluss vermessen. Nach Registrierung eines stabilen Grundeinwärtsstroms bei basaler Glucose (5 mM) (**Kontrolle, links**) wurde der Effekt von MFQ (50 μM) bzw. NIS (1 μM) untersucht (**Mitte**) und die Reversibilität nach Auswaschen beobachtet (**rechts**). Registrierungen repräsentativ für 8 (NIS) bzw. 6 (MFQ) Versuche.

Während bei Nisoldipin ($11,5 \pm 2,8 \%$, $n = 8$) und $5\text{--}10 \mu\text{M}$ Mefloquin ($8,9 \pm 1,8 \%$, $n = 7$, bzw. $2,6 \pm 1,5 \%$, $n = 4$) ein gewisser Reststrom erhalten blieb, wurde der Strom durch 25 ($1,2 \pm 0,7 \%$, $n = 5$) und $50 \mu\text{M}$ Mefloquin ($0,8 \pm 0,7 \%$, $n = 6$) quasi vollständig gehemmt.

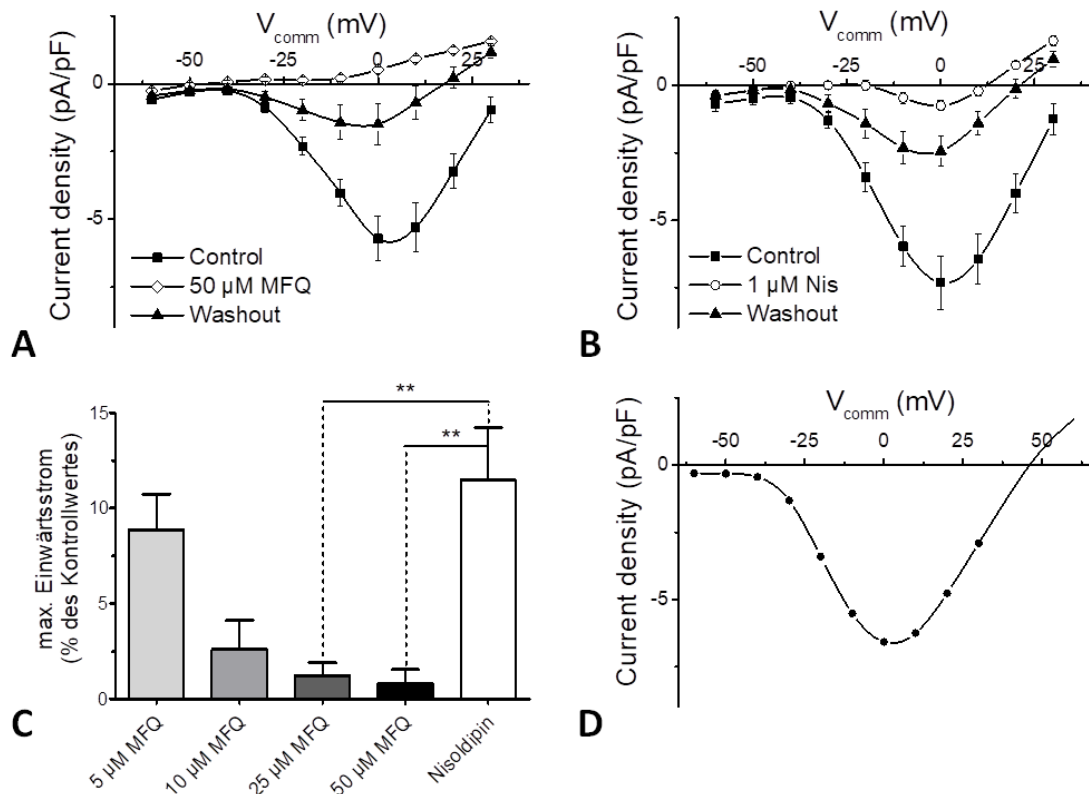


Abbildung 4.14: Hemmung der VDCC durch Mefloquin und Nisoldipin - Auswertung Aus den Versuchen der Abb. 4.13 ergaben sich die oben dargestellten Stromspannungskennlinien (s. Kap. 3.6.4c) für $50 \mu\text{M}$ MFQ (**A**) bzw. $1 \mu\text{M}$ NIS (**B**). (**C**) Konzentrationsabhängigkeit des Resteinstroms in Gegenwart von MFQ ($5\text{--}50 \mu\text{M}$) im Vergleich mit NIS ($1 \mu\text{M}$). MW \pm SEM von 4 bis 8 Experimenten. (**D**) Errechnete Nettokurve des Calciumeinstroms durch L-Typ Calciumkanäle unter Kontrollbedingungen. Für die Erstellung der Kurve wurde die Mittelwertkurve des NIS-Effektes (**B**, Kreise) von der Kontrollkurve (**B**, Quadrate) subtrahiert und anschließend bis zu einer Spannung von $+60 \text{ mV}$ extrapoliert (**: $p = 0,0087$ bzw. $0,0073$; nach Welch-Korrektur).

Damit war die Hemmung von VDCC durch Mefloquin in den Konzentrationen 25 und $50 \mu\text{M}$ signifikant effektiver im Vergleich mit der Wirkung des L-Typ spezifischen Ca^{2+} -Blockers Nisoldipin. Es ist anzunehmen, dass der Reststrom in Anwesenheit des spezifischen Blockers Nisoldipin einen Strom durch spannungsabhängige, aber nicht L-Typ Ca^{2+} -Kanäle darstellt, der durch das weniger spezifische Mefloquin ebenfalls

unterdrückt wird. Durch Subtraktion der Nisoldipinkurve von der Kontrollkurve errechnet sich der Netto-Calciumstrom durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Abb. 4.14D).

Wie bereits in den Messungen des Membranpotentials beobachtet, war die Reaktionsgeschwindigkeit von Mefloquin (5–25 μM) auch in Bezug auf die Calciumkanalblockade langsamer im Vergleich zum spezifischen Blocker (Abb. 4.15). Erst bei einer Konzentration von 50 μM wurde die maximale Hemmung der Calciumkanalaktivität nach $2,6 \pm 0,4$ min und damit signifikant schneller erreicht als mit Nisoldipin.

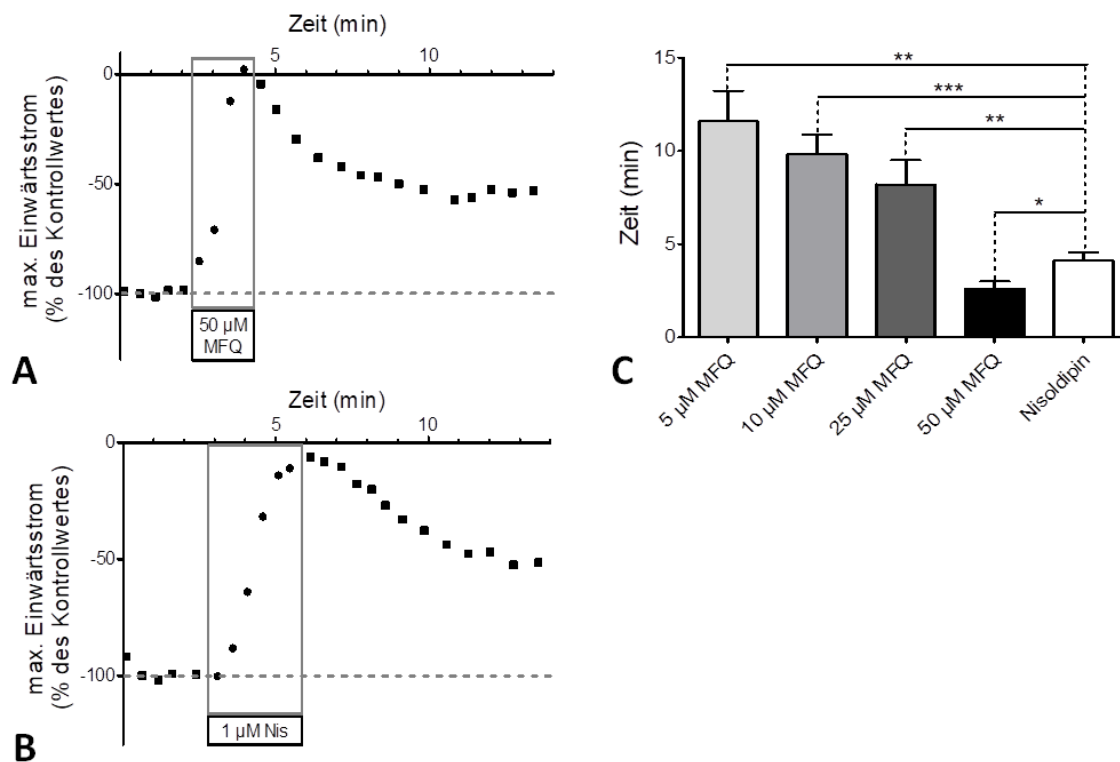


Abbildung 4.15: Kinetik der Calciumkanalblockade mit Mefloquin vs. Nisoldipin (A+B) Für die chronologische Darstellung der Versuche aus Abb. 4.13 und 4.14 wurden die jeweiligen Maxima aller Stromspannungskurven eines Versuchs über der Zeit aufgetragen (s. Kap. 3.6.4c). Beispielhafte Verläufe für 50 μM MFQ (**A**) bzw. 1 μM NIS (**B**). (**C**) Konzentrationsabhängigkeit der Dauer bis zum Erreichen der maximalen Hemmung in Gegenwart von MFQ (5–50 μM) im Vergleich mit NIS (1 μM) (***: $p = 0,0001$, **: $p = 0,0047$ bzw. $0,0045$, *: $p = 0,0305$).

Bei genauem Vergleich der Abbildungen 4.14A und 4.14C fällt auf, dass die Werte des in Anwesenheit von 50 μM Mefloquin gemessenen Stroms nicht identisch sind. Während der depolarisierenden Spannungspulse kam es teilweise zu positiven Werten

der Stromantwort. Die Strom-Spannungs-Kennlinien stellen nicht nur die Einwärtsströme mit negativem Ausschlag, sondern den gesamten gemessenen Strom dar und haben infolgedessen z.T. positive Werte. Für die Bewertung des Effektes von Mefloquin auf den Calciueinwärtsstrom in Abb. 4.14C wurden diese entgegengerichteten Ströme ignoriert. Zum Test, ob es sich bei diesen auswärtsgerichteten Strömen möglicherweise um durch Mefloquin veränderte Leitfähigkeiten weiterer spannungsgesteuerter Kanäle oder Artefakte der Leckstromkompensation handelt, wurden kontinuierliche *Voltage Clamp*-Versuche am EPC7-Set-up durchgeführt, bei dem keine Leckstromkompensation vorgenommen wird. Die oberen Spuren der Abb. 4.16A+B zeigen das hier genutzte Stimulationsprotokoll, bei dem von einem Haltepotential von -50 mV ausgehend in 10 mV Schritten abwechselnd hyper- bzw. depolarisiert wurde. Die abhängig vom vorgegebenen Potential mal mehr, mal weniger starken, auswärtsgerichteten Kaliumströme in den ersten 1,5 min wurden durch Tolbutamid und TEA vollständig unterdrückt, sodass der gemessene Strom die Nulllinie erreichte. Dadurch wurde der während der depolarisierenden Pulse auftretende Calciueinwärtsstrom sichtbar. Nachdem dieser durch Nisoldipin blockiert wurde, waren nur noch kapazitive Ströme infolge der Spannungspulse erkennbar. Die Zugabe von Mefloquin führte zu keinem verstärkten auswärtsgerichteten Stromfluss. Mefloquin induziert also keinen Auswärtsstrom.

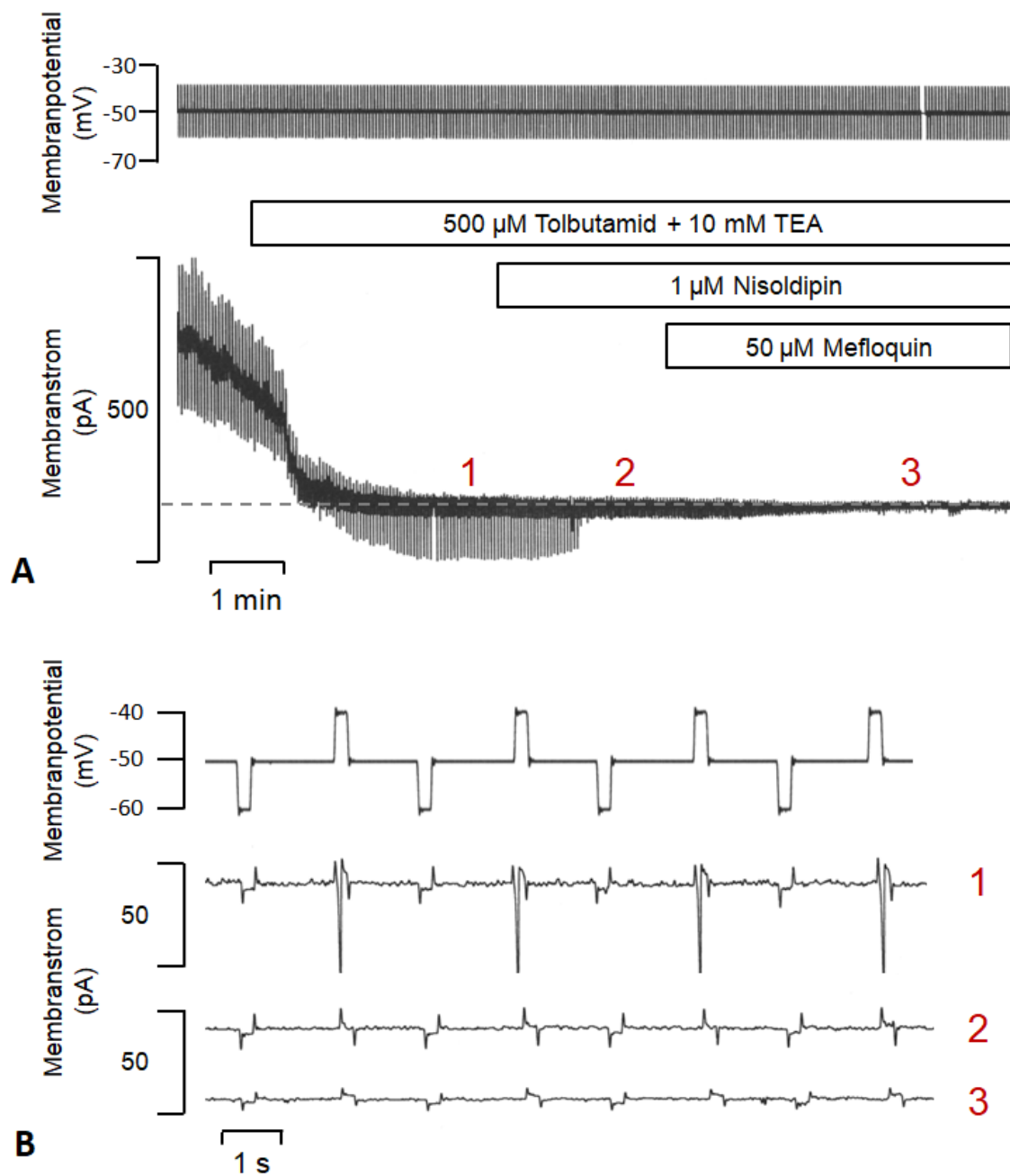


Abbildung 4.16: Induktion von Auswärtsströmen durch Mefloquin in Anwesenheit von Nisoldipin nicht nachweisbar Einzelne, kultivierte β -Zellen wurden am EPC7-Set-Up (s. Kap. 3.6.2a) in der konventionellen *whole cell*-Konfiguration gepatcht und im *Voltage Clamp* auf ein Haltepotential von -50 mV geklemmt. Davon ausgehend wurden sie mit Spannungspulsen von 10 mV abwechselnd hyper- und depolarisiert und der resultierende Strom kontinuierlich gemessen (s. Kap. 3.6.4b). Während des Versuchs wurden die Zellen kontinuierlich mit basaler Glucose (5 mM) und den angegebenen Substanzen umströmt. **(A)** Originalregistrierung. Die obere Spur zeigt das Stimulationsprotokoll, die untere den gemessenen Membranstrom, die gestrichelte Linie zeigt den Nullstrom an. Registrierung repräsentativ für 4 Versuche. **(B)** Ausschnitte der Originalregistrierung zu den in **(A)** markierten Zeitpunkten mit gestreckten Achsen inkl. angepasster Stimulationsdarstellung (**oben**).

Zur Untermauerung der Hypothese, dass es sich bei den durch Mefloquin blockierten Kanälen in erster Linie um L-Typ Calciumkanäle handelt, wurden weitere *Voltage Clamp*-Versuche unternommen. In diesen Versuchen wurde der Ca^{2+} -Einstrom durch den Öffner von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen (\pm)-Bay K8644 verstärkt (Abb. 4.17, $n = 5$). Mefloquin (50 μM) hemmte auch diese zusätzliche Stromkomponente vollständig.

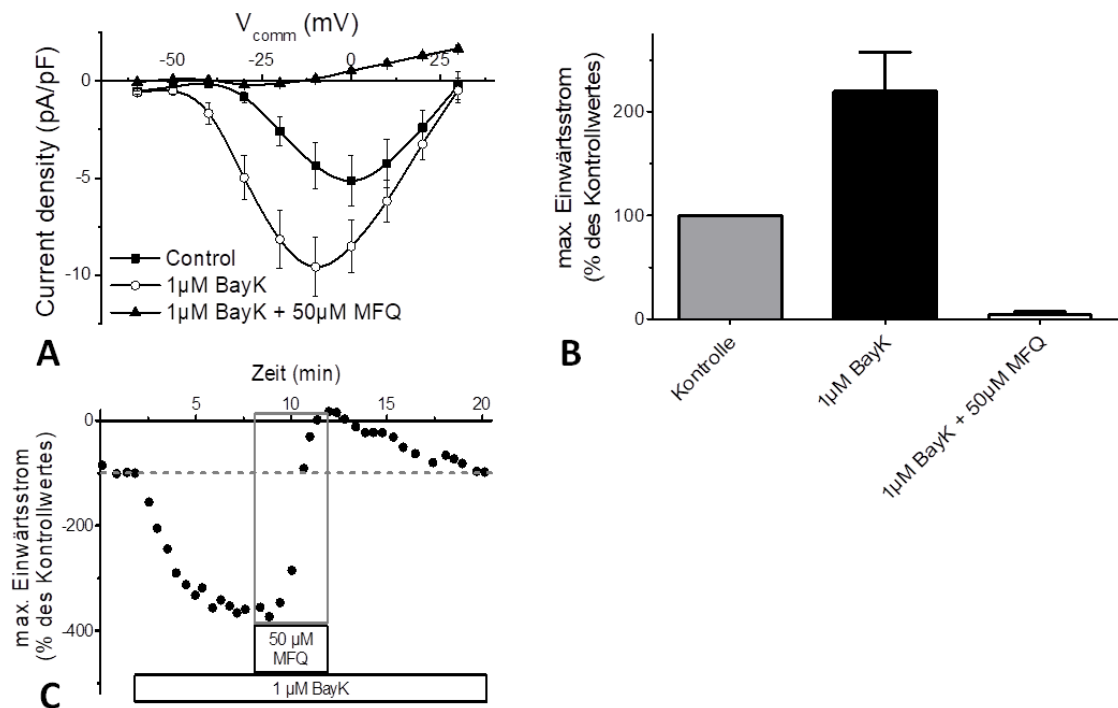


Abbildung 4.17: Antagonismus zwischen Mefloquin und Bay K Stromspannungskurven (A) und maximale Calciumeinstwärtsströme (B) von *Voltage Clamp*-Messungen, bei denen die β -Zellen in Anwesenheit von 1 μM Bay K mit 50 μM MFQ umströmt wurden. MW \pm SEM von 5 Versuchen. (C) Repräsentativer Zeitverlauf eines solchen Versuches

4.2.4 Mikrofluorimetrische Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$: Mefloquin hemmt den Tolbutamid-induzierten Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration

In Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einzelner β -Zellen bestätigte sich diese Ca^{2+} -Einstrom-hemmende Wirkung des Mefloquins. Mit einem Versuchsprotokoll, das dem in Abb. 4.12 gezeigten entsprach, wurde die Wirkung von Tolbutamid zunächst allein und nach einer Auswaschphase in Gegenwart von Mefloquin getestet (Abb. 4.18). Es zeigte sich, dass der Tolbutamid-induzierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Anwesenheit von Mefloquin vollständig blockiert wurde, während die zweite Tolbutamidexposition im

Kontrollversuch ohne Mefloquin zu einem erneuten deutlichen Anstieg führte. Während der Mefloquinexposition kam es zu einem vorübergehenden, leichten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, der nach etwa fünf Minuten sein Maximum erreichte (Abb. 4.18A).

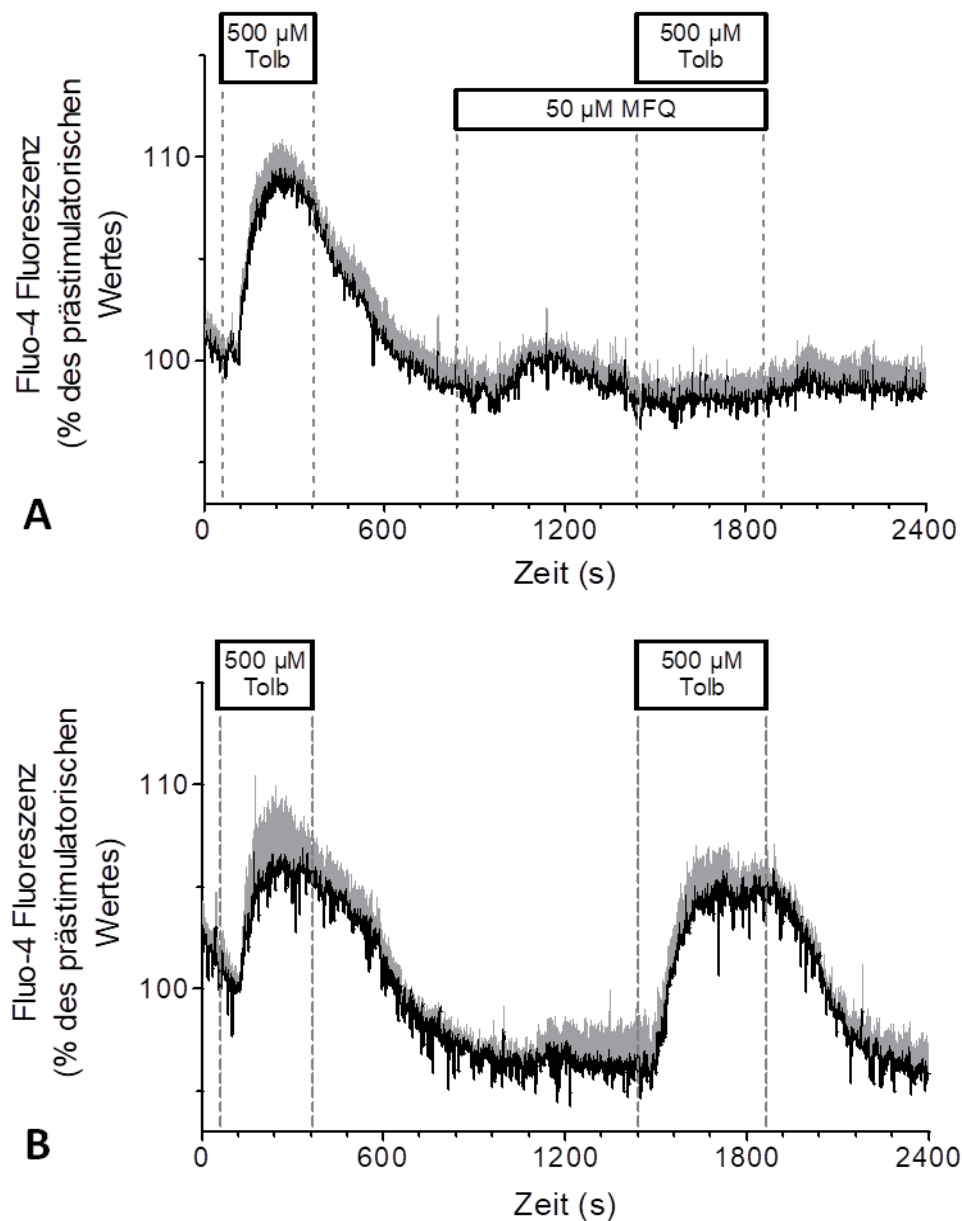


Abbildung 4.18: Mefloquin blockiert den Tolbutamid-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ Mikrofluorimetrische Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ einzelner, kultivierter β -Zellen bei basaler Glucose (5 mM). **(A)** Nachdem zunächst der Calciumanstieg mit Tolbutamid allein registriert worden war (erste Zufuhr), wurde die Umströmung mit Tolbutamid in Gegenwart von 50 µM MFQ wiederholt. **(B)** Kontrollmessung ohne MFQ. MW \pm SEM von 6 (mit MFQ) bzw. 3 (Kontrolle) Versuchen.

4.2.5 Messungen der Insulinsekretionsrate: Mefloquin hemmt die depolarisationsinduzierte, nicht aber die Glucose-induzierte Insulinsekretion

Die Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms legte nahe, dass ebenfalls eine Hemmung der Insulinsekretion zu beobachten sein müsste. Dies wurde in Perifusionsmessungen mit anschließendem Insulin-ELISA überprüft.

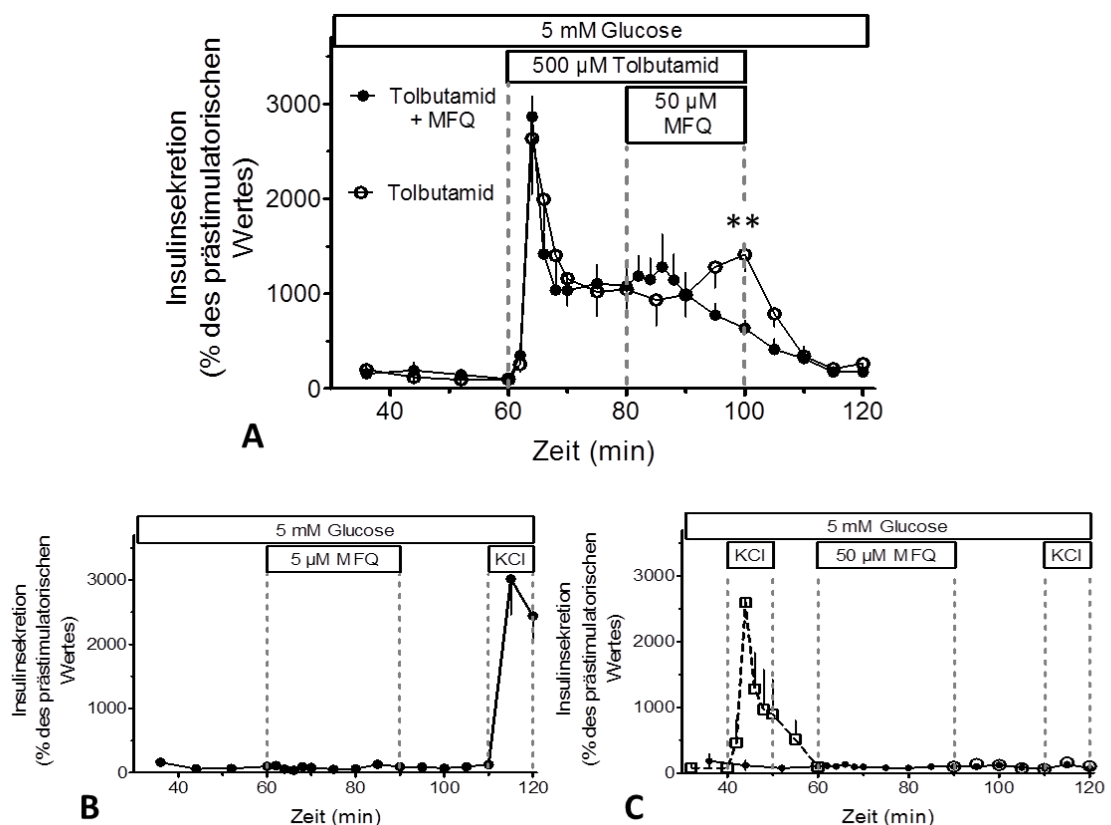


Abbildung 4.19: Mefloquin hemmt die depolarisationsinduzierte Insulinsekretion Gruppen von 50 kultivierten Inseln wurden zunächst für 40 bzw. 60 min mit Krebs-Ringer-Medium und 5 mM Glucose perfundiert. Anschließend enthielt das Medium zusätzlich die jeweils angegebenen Substanzen. **(A)** Wirkung von 50 µM Mefloquin auf die mit 500 µM Tolbutamid gesteigerte Sekretionsrate (geschlossene Kreise) und Kontrollversuch ohne Mefloquin (offene Kreise). MW ± SEM von 4 (mit Mefloquin) bzw. 5 (Kontrolle) Versuchen. **(B)** Wirksamkeit der Kaliumdepolarisation nach vorangegangener Exposition mit 5 µM Mefloquin. MW ± SEM von 5 Versuchen. **(C)** Verlust der Wirksamkeit der Kaliumdepolarisation nach vorangegangener Exposition mit 50 µM Mefloquin. In 3 Versuchen wurde vorher das Ausmaß des ungehemmten Kaliumeffektes dokumentiert (**Quadrate**). MW ± SEM von 6 Versuchen. (**: $p = 0,0082$)

Nach einem kurzen, schwachen Anstieg senkte Mefloquin die durch Tolbutamid gesteigerte Insulinsekretion bei Minute 100 um mehr als die Hälfte im Vergleich zur

Kontrolle ($637 \pm 83 \%$ vs. $1412 \pm 176 \%$) (Abb. 4.19A, $n = 4-5$). Die alleinige Anwesenheit von Mefloquin (5 oder 50 μM) über 30 min hatte keinen Einfluss auf die Sekretionsrate (Abb. 4.19B+C). Wurde die Kaliumkonzentration im Perifusionsmedium nach Auswaschen von 5 μM Mefloquin auf 40 mM erhöht, kam es zu einem für die Kaliumdepolarisation typischen Anstieg der Sekretion (Abb. 4.19B, $n = 5$). 50 μM Mefloquin hatte dagegen auch nach 20-minütigem Auswaschen einen anhaltend hemmenden Effekt auf die Insulinsekretion, sodass der Anstieg mit 40 mM KCl ausblieb (4.19C, Kreise, $n = 3$).

Zum Abschluss wurde in simultanen Messungen der Sekretionsrate und der cytosolischen Calciumkonzentration intakter Inseln der Effekt von Mefloquin auf die Glucose-induzierte Sekretion untersucht und mit dem auf die depolarisationsinduzierte Sekretion verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass 50 μM Mefloquin die durch 40 mM KCl erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deutlich und die daraus resultierende gesteigerte Insulinsekretion vollständig blockierte. Dieser Effekt blieb bei Stimulation mit 30 mM Glucose jedoch aus (Abb. 4.20, je $n = 4$). Tatsächlich steigerte Mefloquin in diesem Fall sogar beide Parameter erneut um sie anschließend auf einem erhöhten Level zu stabilisieren.

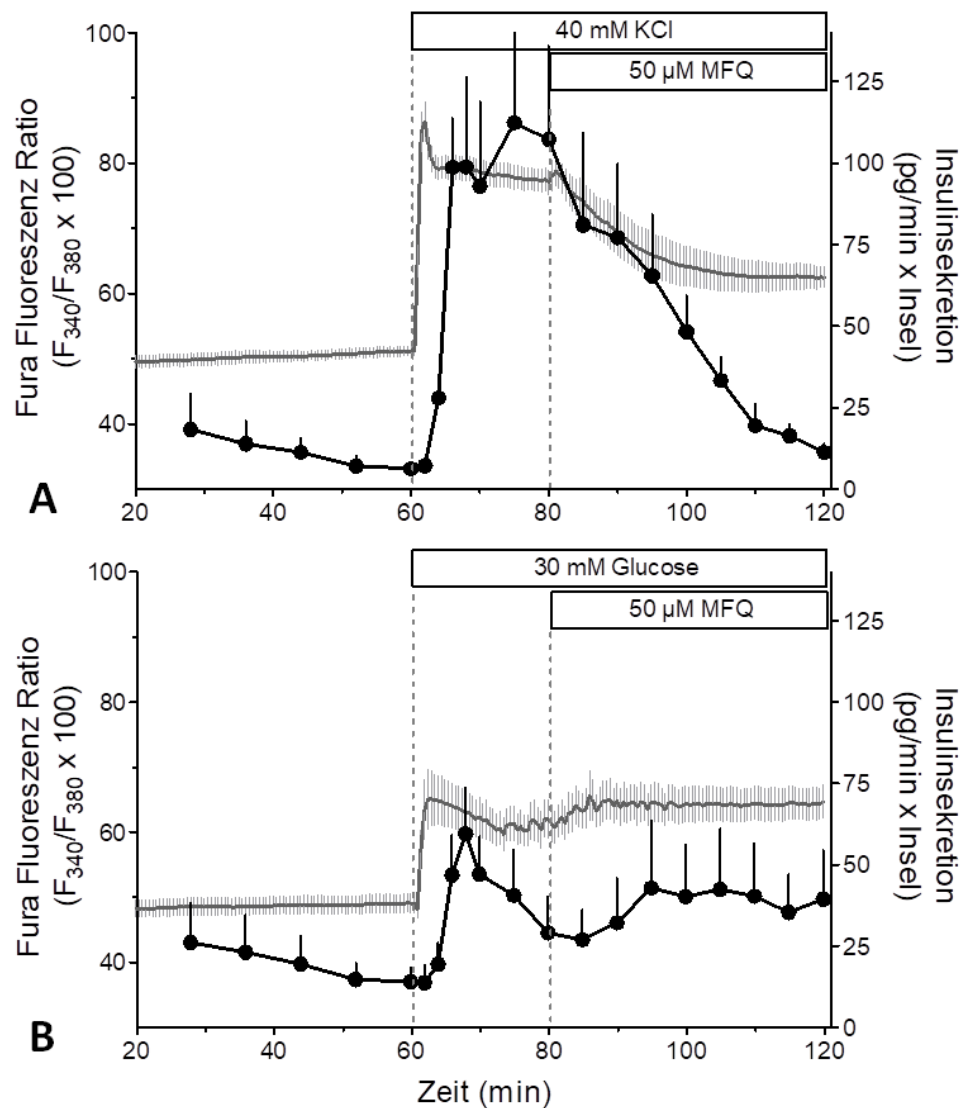


Abbildung 4.20: Mefloquin hemmt den depolarisations- aber nicht den Glucose-induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der Insulinsekretion Simultane Messungen der Insulinsekretion (schwarze Kurve) und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (graue Kurve) an intakten, kultivierten Inseln. Nach einem Vorlauf bei basaler Glucose (5 mM) über 60 min wurde entweder mit 40 mM KCl (**A**) oder 30 mM Glucose (**B**) stimuliert und anschließend 50 μM MFQ dazugegeben. MW \pm SEM von je 4 Experimenten.

4.3 Beeinflussung der β -Zellfunktion durch Diazoxid

Auch Diazoxid, ein K_{ATP} -Kanalöffner, der in Kombination mit hohen Kaliumkonzentrationen zur Erforschung der Signalwege der Insulinsekretion eingesetzt wird, wurde hinsichtlich seiner Eignung als experimentelles Werkzeug untersucht.

4.3.1 Membranpotentialmessungen: *Diazoxid hemmt Glucose-induzierte Aktionspotentiale, eine Kalium-induzierte Depolarisation bleibt erhalten*

In Membranpotentialmessungen an einzelnen, kultivierten β -Zellen wurde der Effekt von 250 μ M Diazoxid auf Aktionspotentiale untersucht, die durch die Kombination von 15 mM KCl und 10 mM Glucose ausgelöst wurden. Nach Depolarisation von -62 mV auf -37 mV mit 15 mM KCl wurden durch Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM Aktionspotentiale mit einem Plateaupotential von -35 mV ausgelöst. Die zusätzliche Anwesenheit von Diazoxid unterdrückte die Aktionspotentiale, repolarisierte die β -Zellmembran aber nur schwach um 7 mV (Abb. 4.21). Hierbei handelt es sich um einen Einzelversuch, bei dem das Protokoll dem der nachfolgenden Versuche angepasst wurde. Weitere Membranpotentialmessungen mit veränderter Reihenfolge der zugeführten Substanzen (erst Glucose, dann KCl) bestätigen aber den hier gezeigten Diazoxideffekt.

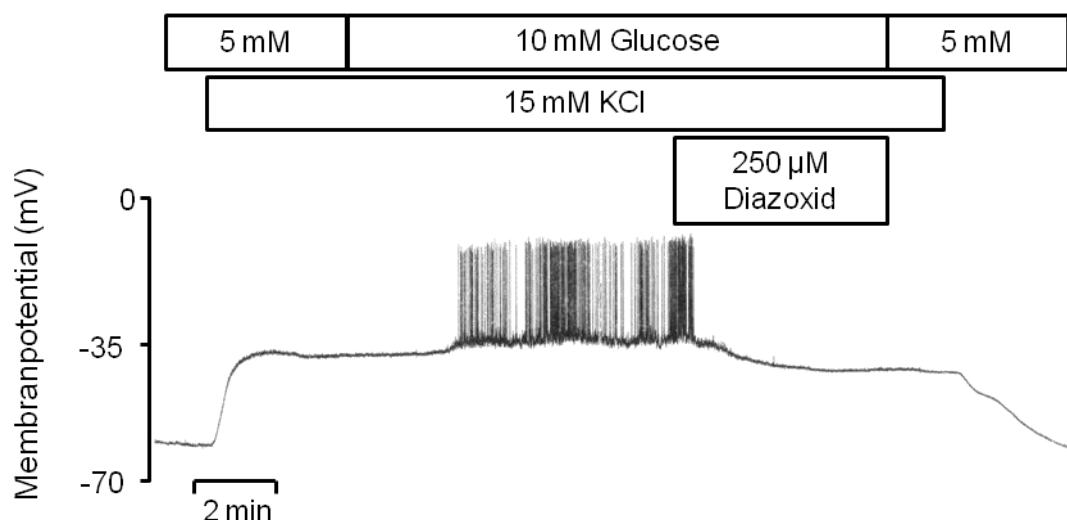


Abbildung 4.21: Unterdrückung von Glucose-induzierten Aktionspotentialen, aber Erhalt der Kalium-induzierten Depolarisation in Anwesenheit von Diazoxid Membranpotentialmessungen an einzelnen, kultivierten β -Zellen im *Current Clamp*-Modus. Die Zellen wurden zunächst mit basaler Glucose (5 mM) und anschließend mit den angegebenen Substanzen umströmt. Einzelversuch

4.3.2 Messungen der Insulinsekretionsrate: Diazoxid hemmt die Glucose-induzierte Insulinsekretion in Anwesenheit von 15 mM KCl

In Sekretionsmessungen an frisch isolierten Inseln mit derselben Wirkstoffkombination wie in Abb. 4.21 resultierte die Zugabe von Diazoxid in einer vollständigen Unterdrückung der zunächst deutlich gesteigerten Insulinsekretion (Abb. 4.22, $n = 6$). Die alleinige Anwesenheit von 15 mM KCl, welche in Abb. 4.21 zu einer deutlichen Depolarisation der β -Zellen führte, hatte hier nur einen sehr schwachen und vorübergehend stimulierenden Effekt.

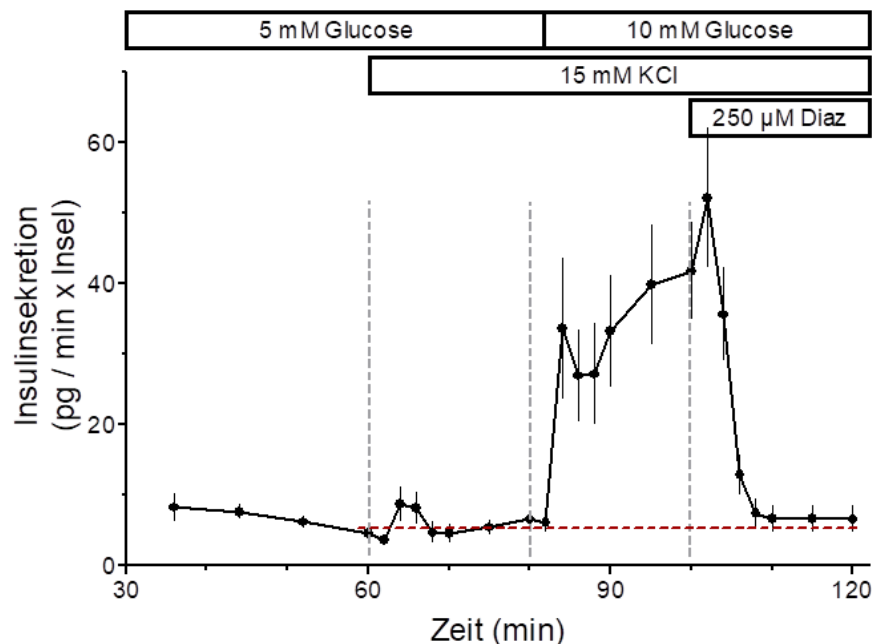


Abbildung 4.22: Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch Diazoxid trotz Gegenwart von 15 mM KCl Die Insulinsekretion von Gruppen von 50 frisch isolierten Inseln wurde mithilfe eines an die Versuche aus der Abb. 4.21 angelehnten Protokolls bestimmt. MW \pm SEM von 6 Versuchen.

4.3.3 Mikrofluorimetrische Messungen der $[Ca^{2+}]_i$: Unter gleichen Bedingungen senkt Diazoxid die cytosolische Calciumkonzentration

Die infolgedessen mit dem gleichem Protokoll durchgeführten Messungen der Fura-Fluoreszenz intakter, kultivierter Inseln zeigten, dass der Kalium- und Glucose-induzierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ebenfalls – wenn auch nicht vollständig – durch Diazoxid reduziert wurde (Abb. 4.23, $n = 3$). Zudem fiel auf, dass das Calciumlevel der

insulinotropen Kombination aus 10 mM Glucose und 15 mM KCl unterhalb des initialen Calciumpeaks blieb, welcher durch die substimulatorische Kaliumkonzentration allein hervorgerufen wurde.

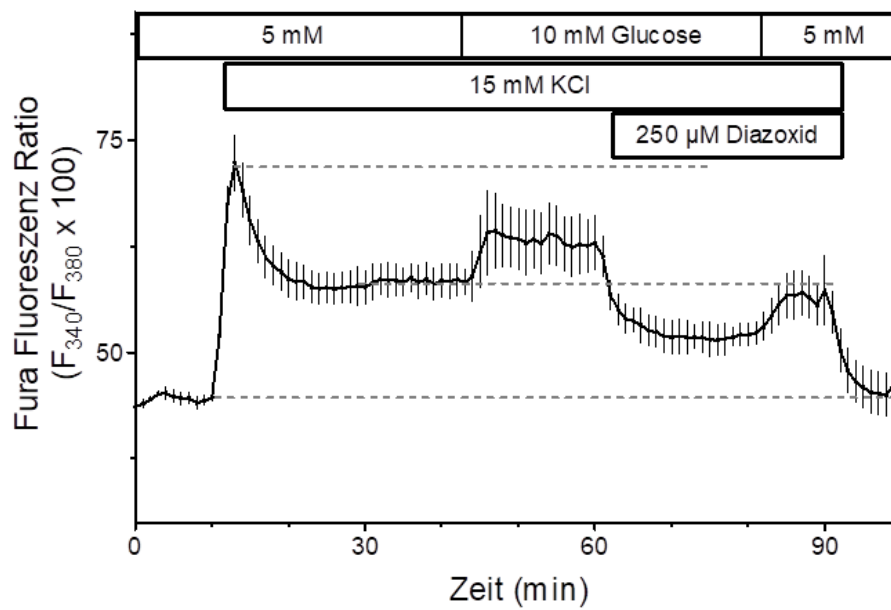


Abbildung 4.23: Teilweise Reduktion der durch Glucose und Kalium erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ durch Diazoxid Mikrofluorimetrische Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2 an einzelnen, kultivierten Inseln. Wie in Abb. 4.21 und 4.22 wurde im Perifusionsmedium zunächst die Kaliumkonzentration auf 15 mM, dann die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht und anschließend 250 μ M Diazoxid hinzugefügt. MW \pm SEM von 3 Versuchen.

4.3.4 Mikrofluorimetrische Messungen des mitochondrialen Membranpotentials: *Diazoxid bewirkt eine Depolarisation der Mitochondrien*

In fluorimetrischen Potentialmessungen der Mitochondrienmembran mit Rhodamin123 (Rh123) führte die Behandlung einzelner β -Zellen mit Diazoxid (0,1–1 mM) zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Rhodaminfluoreszenz (110 ± 2 % (100 μ M), 128 ± 3 % (500 μ M) und 151 ± 8 % (1 mM)), was eine Depolarisation der Mitochondrien anzeigt (Abb. 4.24A, $n = 3$). Außerdem wurde das Ausmaß der Depolarisation mit 250 μ M Diazoxid – der Konzentration, die in den vorangegangenen Versuchen eingesetzt wurde – in weiteren Rhodaminmessungen mit dem Effekt des Atmungsketteninhibitors Natriumazid verglichen. Dabei hatte Diazoxid einen etwas schwächeren Effekt als das mit einem Entkoppler vergleichbare Natriumazid in

maximal effektiver Konzentration (Abb. 4.24B, Rh123-Fluoreszenz etwa 116 % (Diazoxid) vs. 129 % (NaN_3), $n = 3$).

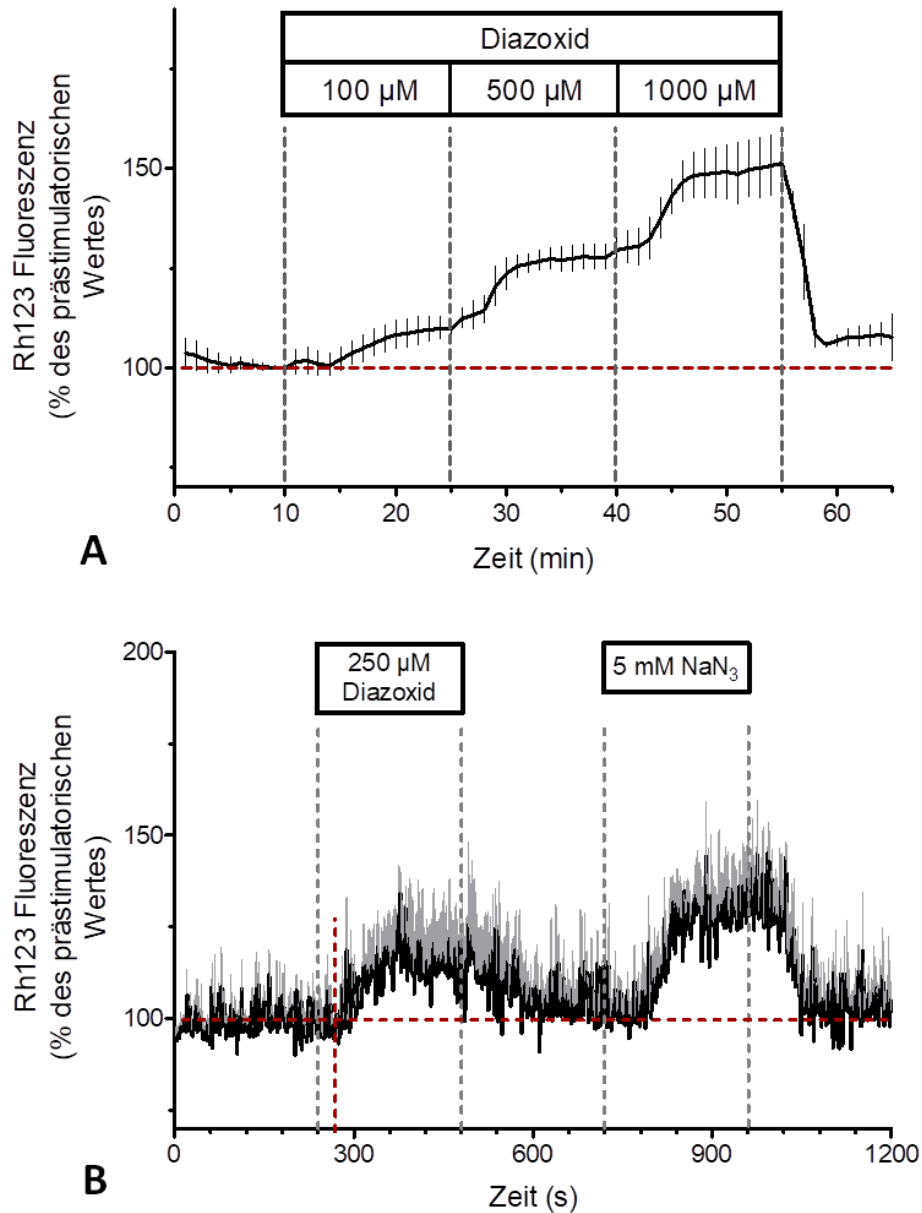


Abbildung 4.24: Depolarisation der Mitochondrienmembran durch Diazoxid Mikrofluorimetrische Messungen des mitochondrialen Membranpotentials einzelner β -Zellen bei basaler Glucose (5 mM). Eine verstärkte Fluoreszenz ist als Depolarisation der Mitochondrienmembran zu deuten. **(A)** Messungen mit Diazoxid in steigender Konzentration (100 – 1000 μM). Die Werte wurden minütlich aufgenommen. MW \pm SEM von 22 Zellen bei 3 Versuchen. **(B)** Der Effekt von 250 μM Diazoxid wurde mit dem von 5 mM Natriumazid verglichen. Hier erfolgte die Registrierung der Rhodaminfluoreszenz mit einer Frequenz von 2 Hz. MW \pm SEM von 3 Zellen bei 3 Versuchen.

4.3.5 Messungen des Adeninnucleotidgehaltes: Diazoxid beeinflusst die Bildung von ATP, ADP und AMP

Zum Abschluss wurde der dadurch vermutete Effekt auf den Adeninnucleotidgehalt mithilfe der Luciferasemethode an frisch isolierten Inseln untersucht (Abb. 4.25). Es zeigte sich, dass unter Einfluss von Diazoxid und ausgehend von dem Wert mit erhöhter Glucose- und Kaliumkonzentration die ATP/ADP-Ratio auf 86 % erniedrigt wurde, während die ATP/AMP-Ratio auf 118 % stieg. Diese Veränderungen waren allerdings nicht statistisch signifikant.

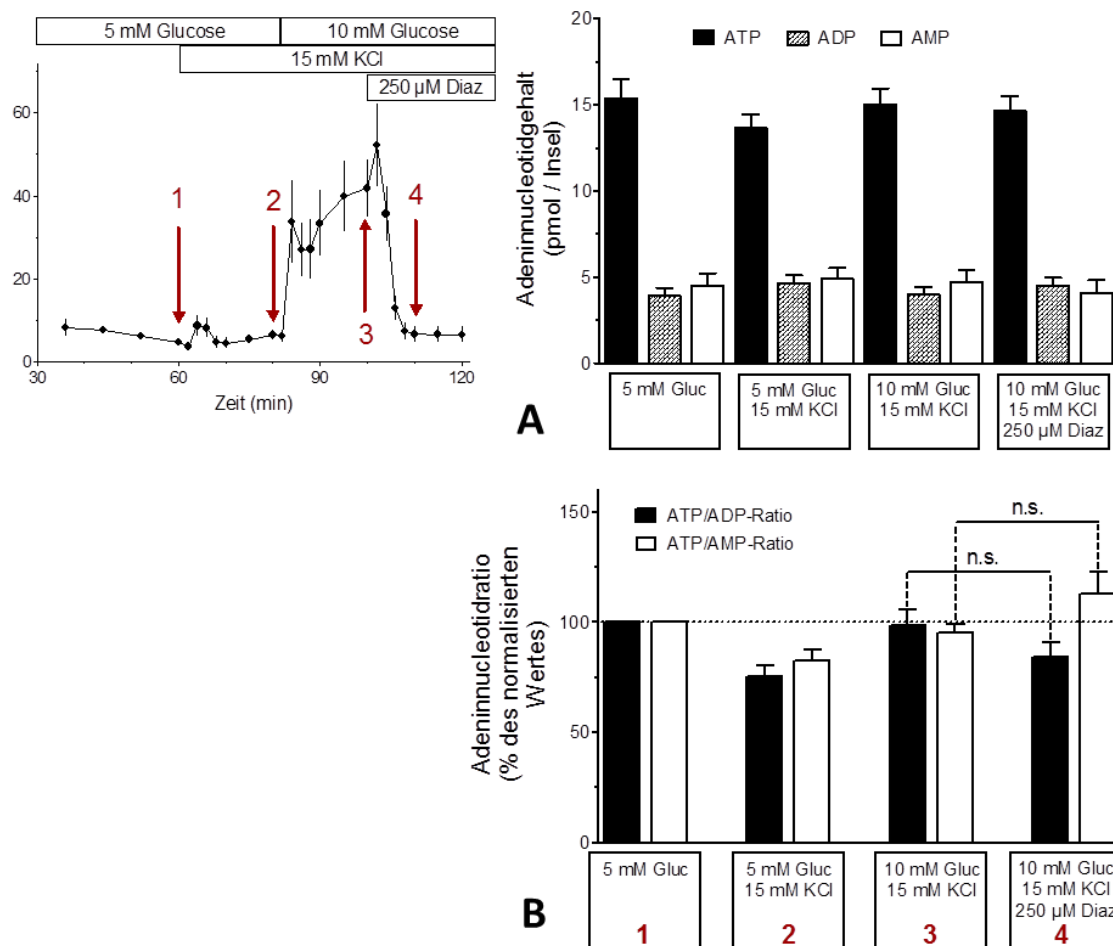


Abbildung 4.25: Beeinflussung des Adeninnucleotidgehalts durch Diazoxid Unter statischen Inkubationsbedingungen, die den in der Sekretionsmessung (oben links, Abb. 4.22) markierten Zeitpunkten entsprechen, wurde der Adeninnucleotidgehalt von Gruppen von 15 frisch isolierten Inseln mithilfe der Luciferasemethode bestimmt. **(A)** Gehalt der Nucleotide ATP, ADP und AMP in den Inseln. **(B)** Aus den Ergebnissen aus **A** errechnete ATP/ADP-Ratio bzw. ATP/AMP-Ratio. Werte normalisiert auf Basalbedingungen. MW \pm SEM von 10 Versuchen. (n.s.: $p = 0,1449$ bzw. $0,1538$; zweiseitiger, gepaarter t-Test)

5 DISKUSSION

In der Forschung an biologischem Material hat sich für verschiedene Untersuchungen der Einsatz pharmakologischer Werkzeuge etabliert. Eine zuverlässige und korrekte Interpretation der mit solchen Mitteln gewonnenen Ergebnisse erfordert jedoch eine umfangreiche Kenntnis der von ihnen in dem jeweiligen Gewebe bewirkten Effekte. Die am besten geeigneten Mittel sind dabei diejenigen mit besonders hoher Spezifität für ein definiertes Target, wie z.B. einen bestimmten Ionenkanal.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei gängige pharmakologische Werkzeuge der Insulinsekretionsforschung hinsichtlich ihrer Spezifität und möglicher weiterer Effekte auf Funktionen der pankreatischen β -Zellen untersucht.

5.1 Die Kaliumdepolarisation verstärkt den Calciumeinwärtsstrom, aber nicht über eine direkte Interaktion mit L-Typ Calciumkanälen

Die Kaliumdepolarisation ist ein Mittel, das im Rahmen von Untersuchungen zur metabolischen Amplifikation zur Nachahmung der ersten Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion genutzt wird (Gembal et al. 1992). Durch die Depolarisation der β -Zellmembran mit Kaliumchlorid (üblicherweise 30 mM oder mehr) öffnen spannungsabhängige Calciumkanäle und der resultierende Calciumeinwärtsstrom bewirkt die Freisetzung des in Sekretgranula gespeicherten Insulins.

Unsere Arbeitsgruppe beobachtete jedoch, dass die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration nicht nur eine stimulierende Wirkung, sondern ab 40 mM zusätzlich einen hemmenden Effekt auf einen anschließenden Glucosestimulus hatte (Willenborg et al. 2012). Bei genauerer Betrachtung der Effekte der Kaliumdepolarisation durch Belz et al. (2014) fiel unter anderem auf, dass 15 und 40 mM Kalium zu einer Depolarisation führten, die der Berechnung nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung entsprachen, die üblichen auf die Depolarisation folgenden Aktionspotentiale blieben jedoch aus. Dies konnte damit erklärt werden, dass die Glucose-induzierten β -Zell-Aktionspotentiale ein Ausdruck des Calciumeinwärtsstroms durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle im Wechsel mit repolarisierenden Kaliumauswärtsströmen sind (Ribalet and Beigelman 1980). Da jedoch bei der Kaliumdepolarisation anders als bei der Glucose-induzierten Depolarisation die K_{ATP} -Kanäle nicht blockiert werden, kommt es nicht nur bei der Repolarisation der

Aktionspotentiale, sondern bereits während des Calciumeinstroms zu einem kompensierenden Kaliumauswärtsstrom. Dadurch sind die Aktionspotentiale trotz des existierenden Calciumeinstroms mit der Patch-Clamp-Technik nicht mehr als solche darstellbar.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich das Muster des in Anwesenheit der Kaliumkanalblocker Tolbutamid und TEA sichtbaren Calciumeinstroms unter Einfluss hoher Kaliumkonzentrationen veränderte. Die einzelnen, scharf getrennten Aktionsströme verschmolzen zu verlängerten Einwärtsströmen unterbrochen von ebenfalls verlängerten Ruhephasen (15 mM KCl) bzw. zu einem kontinuierlichen Einwärtsstrom (40 mM KCl) (Belz et al. 2014).

5.1.1 Effektivität verschiedener Calciumkanalblocker in elektrophysiologischen Messungen im Vergleich mit anderen Methoden

Es sollte nun mithilfe der Patch-Clamp-Technik untersucht werden, in welchem Ausmaß dieser veränderte Calciumeinwärtsstrom zu der depolarisierenden Wirkung hoher Kaliumkonzentrationen beiträgt. Die Kombination von 40 mM KCl, Tolbutamid und TEA bewirkte eine starke Depolarisation, Aktionspotentiale waren jedoch nicht erkennbar. Dies passt zu der oben beschriebenen Beobachtung, dass 40 mM KCl die Calciumaktionsströme in einen kontinuierlichen Einstrom verwandelt. Die Zugabe der Calciumkanalinhibitoren Cobaltchlorid (CoCl_2) und D600, einem Verapamilderivat, hatte einen signifikanten, wenn auch geringen, repolarisierenden Effekt auf das Membranpotential. Bei diesen beiden Substanzen handelt es sich um direkte Blocker der Ionenpore (Catterall and Swanson 2015). Nur unter Einfluss des allosterisch wirkenden L-Typ Calciumkanalblockers Nifedipin war keine signifikante Repolarisation mehr feststellbar. Auch dies ist im Einklang mit den bereits veröffentlichten Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, bei denen CoCl_2 den kontinuierlichen Calciumeinwärtsstrom vollständig unterdrückte, während Nifedipin wirkungslos war (Belz et al. 2014).

Es gibt Hinweise darauf, dass D600 ebenso wie Verapamil neben L-Typ Calciumkanälen weitere Strukturen wie z.B. T-Typ Kanäle oder den kardialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher beeinflusst (Horackova 1985; Lacinová and Klugbauer 2004). Für Nifedipin dagegen konnte eine recht hohe Selektivität für L-Typ Kanäle nachgewiesen werden (Furukawa et al. 1999). Zieht man die Erkenntnis von Belz et al. (2014) hinzu, dass Nifedipin in Anwesenheit von 15 mM KCl durchaus noch in der

Lage ist, die veränderten Calciumströme zu hemmen, und erst bei 40 mM seine Wirksamkeit verliert, so liegt die Vermutung nahe, dass durch steigende Kaliumkonzentrationen nicht nur L-Typ Kanäle geöffnet, sondern noch weitere Mechanismen aktiviert werden, die den Calciumeinstrom verstärken.

In scheinbarem Widerspruch dazu stehen die Messungen der cytosolischen Calciumkonzentration. Hier war Nifedipin genauso wie CoCl_2 im Stande, das durch die gleiche Wirkstoffkombination (40 mM KCl + Tolbutamid + TEA) stark erhöhte Calciumlevel auf prästimulatorische Werte zu senken. Der Einstrom durch L-Typ Calciumkanäle hat also weiterhin große Relevanz in Bezug auf die insulinotrope Wirkung der Kaliumdepolarisation. Dies spiegelt sich auch in Messungen der Sekretionsrate wieder, bei denen Nifedipin den stimulatorischen Effekt von 40 mM KCl plus Tolbutamid ebenfalls vollständig antagonisierte (Belz et al. 2014). Nifedipin, welches wie alle Dihydropyridine vorzugsweise an den L-Typ Kanal im inaktivierten Zustand bindet (Sanguinetti and Kass 1984), scheint seine Wirksamkeit unter Bedingungen des *Voltage* und *Current Clamps* schlechter entfalten zu können als in physiologienäheren Versuchen, bei denen Stromfluss und Membranpotential der Zelle frei veränderbar bleiben. Es stellt sich daher die Frage, in wie fern mit elektrophysiologischen Methoden gemachte Beobachtungen auf physiologische Vorgänge extrapolierbar sind.

Interessanterweise kam es in Anwesenheit von 15 mM KCl, Tolbutamid und TEA zu einem Oszillieren des Calciumsignals, welches bei 40 mM KCl ein weiter erhöhtes, aber ebenes Plateau erreichte. Hier ist der unmittelbare Zusammenhang zwischen verändertem Aktionsstrommuster und der cytosolischen Calciumkonzentration klar erkennbar.

5.1.2 *Simultane Messungen der cytosolischen Calciumkonzentration und des Membranpotentials*

Die Frage, ob die Messung der cytosolischen Calciumkonzentration einer geclampten Zelle dasselbe Ergebnis liefern würde wie eine Zelle, die die Parameter Membranpotential und Membranstrom frei regulieren kann, brachte eine simultane Versuchsanordnung hervor: eine zur Messung des Membranpotentials im *Current Clamp* gehaltene Zelle wurde gleichzeitig mikrofluorimetrisch vermessen. Dabei wurde mit einem vereinfachten Protokoll begonnen, bei dem die Zellen zunächst nur mit

500 μM Tolbutamid umströmt und die Kaliumkonzentration anschließend sukzessive auf 15 und 40 mM erhöht wurde.

Es zeigte sich allerdings schnell, dass die so gemessenen Anstiege der cytosolischen Calciumkonzentration nur sehr schwach ausfielen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass der Indikator in diesen Fällen bereits bei 15 mM KCl plus Tolbutamid seine Sättigung erreicht hatte und ein weiterer Anstieg der Calciumkonzentration in Anwesenheit von 40 mM KCl deshalb nicht mehr aufgelöst werden konnte. Bei direktem Vergleich mit Messungen, bei denen die Zellen nicht im *Current Clamp* gehalten wurden, aber unter ansonsten gleichen Bedingungen deutlich stärkere Anstiege registriert wurden, erscheint diese Erklärung jedoch unwahrscheinlich.

Wahrscheinlicher ist es, dass unter den Bedingungen des *Current Clamp*-Modus, bei denen der Nettomembranstrom bei null gehalten wird, der Calciumeinstrom der geclampeten Zelle beeinflusst wird (Numberger and Draguhn 1996). Es wurden zwar simultane Versuche dieser Art mit deutlich erkennbaren Veränderungen der cytosolischen Calciumkonzentration und einer eindeutigen Korrelation zwischen Calciumsignal und Membranpotential veröffentlicht. Dies lässt sich aber möglicherweise bereits anhand von Unterschieden in der Methodik erklären. Zum einen wurde mit den Indikatoren Fura-2 und Fura-PE3 gearbeitet und aus der Fluoreszenzratio eine absolute Calciumkonzentration in nmol/l errechnet, während wir die direkt gemessene Fluoreszenzintensität von Fluo-4 (in *counts per second* oder Prozent des Ausgangswertes) darstellen. Zum anderen wurden die Zellen dort auf 37 °C temperiert und nicht wie hier bei Raumtemperatur gearbeitet. Außerdem erfolgten die Messungen bei einer Arbeit an isolierten α - statt β -Zellen. In einer anderen Arbeit wurden die simultanen Versuche nicht an Einzelzellen, sondern an β -Zellen innerhalb intakter Inseln durchgeführt. So konnte das Calciumsignal der gesamten Insel vermessen werden, auf das der *Current Clamp*-Modus keinen Einfluss hatte (Beauvois et al. 2006; Quoix et al. 2009). Nicht zuletzt stellt sich zudem die Frage, ob der gemessene Calciumanstieg nicht auch bei diesen Messungen stärker ausgefallen wäre, wenn die Zellen nicht unter der Kontrolle des *Current Clamps* gestanden hätten.

Grundsätzlich stellt die simultane Betrachtung verschiedener Parameter ein interessantes Konzept dar, bei dem zusätzliche Informationen über direkte Zusammenhänge gewonnen werden können. Bei der Interpretation der auf diese spezielle Weise erhaltenen Werte ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Calciumregistrierung durch die elektrophysiologische Messtechnik beeinflusst wird.

Ein alternativer Ansatz zur simultanen Messung der cytosolischen Calciumkonzentration und des Membranpotentials wäre eine rein mikrofluorimetrische Vermessung unter Zuhilfenahme eines spannungssensitiven Fluoreszenzindikators. Dabei wäre jedoch zu beachten, dass Auflösung und Spezifikation des Spannungs- und des Calciumindikators zusammenpassen. Die Überschneidung der Emissionsspektren von Fluo-4 und einigen Spannungsindikatoren würde die Auswahl hier deutlich einschränken; ein Vertreter der ratiometrischen ANEP-Farbstoffe (Amino-Naphthyl-Ethenyl-Pyridinium) wäre vermutlich geeignet (Fluhler, Burnham, and Loew 1985). Aber auch die Wahl eines anderen Calciumindikators wäre möglich.

Ein weiteres Problem dieser Messungen scheint das Protokoll an sich mit seiner sukzessiven Zugabe mehrerer depolarisierender Substanzen über einen längeren Zeitraum (12 min) darzustellen. Während die Umströmung mit Tolbutamid noch zu einem deutlichen Anstieg der Calciumkonzentration führte, hatte die zusätzliche Erhöhung der Kaliumkonzentration auch in einfachen Fluo4-Messungen nur noch einen geringen Effekt. Dabei hatten sowohl 15 als auch 40 mM KCl jeweils einen starken Anstieg der Fluo4-Fluoreszenz zur Folge, wenn die Zelle nicht bereits mit Tolbutamid depolarisiert worden war. Hinzu kommt, dass das Fluoreszenzsignal nach Zugabe einer depolarisierenden Substanz nach kurzer Zeit ein Maximum erreichte, welches daraufhin schnell auf ein niedrigeres Niveau abfiel. Jedoch war auch dieses nicht konstant. Im Falle von Tolbutamid nahm die Fluo4-Fluoreszenz über einen Zeitraum von 10 min schwach, aber kontinuierlich ab.

Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass die β -Zellen unter diesen Bedingungen über lange Zeit stark depolarisiert sind, in Anwesenheit von 40 mM KCl permanent ein unphysiologisches Membranpotential von etwa -20 mV haben. In diesem Bereich sind die L-Typ Calciumkanäle beinahe maximal aktiviert (s. unten), was wiederum zur verstärkten calcium- und spannungsabhängigen Inaktivierung führt; ein Zustand, dem sie aufgrund der anhaltenden Depolarisation nur schwer wieder entkommen (Göpel et al. 1999; Plant 1988b). Eine weitere Begründung könnte die gesteigerte Umverteilung bzw. Speicherung des cytosolischen Calciums in zellulären Kompartimenten sein, die bei K_{ATP} -Kanalblockade durch z.B. Tolbutamid beobachtet wurde (Düfer et al. 2007).

Ein interessanter Nebenaspekt dieser Messungen ist, dass bei genauerem Hinsehen zwischen dem Anstieg des Membranpotentials und dem der Fluo4-Fluoreszenz ein geringer zeitlicher Versatz von etwa 10 s auszumachen ist. Der Indikator gibt also nicht das Ausmaß des Calciumeinstroms als unmittelbare Folge der Depolarisation wieder, sondern reagiert erst auf den Anstieg nach Verteilung der Calciumionen im Cytosol.

5.1.3 Untersuchungen zur direkten Aktivierung des L-Typ Calciumkanals

Ein neuer Ansatzpunkt zur Ergründung der sekretionssteigernden Mechanismen der Kaliumdepolarisation ergab sich aus einem Zufallsbefund weiterer Membranpotentialmessungen: Analog zum Aktionsstrommuster veränderte sich durch Erhöhung der Kaliumkonzentration auch die Form der Tolbutamid-induzierten Aktionspotentiale. Die üblicherweise schnell aufeinander folgenden und scharf getrennten Aktionspotentiale verschmolzen in Anwesenheit von 15 mM KCl zu breiteren Aktionspotentialen mit etwas größerer Amplitude und wiederum verlängerten Ruhephasen dazwischen. Bei weiterer sukzessiver Erhöhung der Kaliumkonzentration (22,5, 31,5 mM) wurden die Aktionspotentiale bei nun abnehmender Amplitude und steigendem Plateaupotential immer schwerer erkennbar und gingen bei 40 mM letztendlich in ein undefiniertes Rauschen über.

Interessant war dabei v.a. die Verbreiterung der Aktionspotentiale durch 15 mM KCl, die wir zuvor in ähnlicher Form, wenn auch nicht ganz so stark ausgeprägt, in Anwesenheit von Tolbutamid und (\pm)-Bay K8644 (Bay K) beobachtet hatten. Bei Bay K handelt es sich um ein Dihydropyridin (DHP), dessen zwei Enantiomere gegensätzliche pharmakologische Wirkung zeigen. Während das (R)-(+)-Enantiomer, so wie es für die DHP bekannt ist, Calciumkanäle blockiert, hat das (S)-(-)-Enantiomer bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen eine agonistische Wirkung, wodurch sowohl das reine (S)-(-)-Enantiomer als auch das Racemat als L-Typ Calciumkanalöffner dienen (Bechem und Schramm 1987; Franckowiak et al. 1985; Nowycky, Fox, und Tsien 1985). Diese entgegengesetzte Wirkweise der zwei Enantiomere unterstützt dabei die Auffassung der DHP als Calciumkanalmodulatoren, während andere Calciumantagonisten (Phenylalkylamine, z.B. Verapamil, und Benzothiazepine, z.B. Diltiazem) als reine Ionenporenblocker fungieren (Catterall and Swanson 2015).

Daraus ergab sich die Frage, ob die stimulatorische Wirkung der Kaliumdepolarisation auf den Calciueinstrom möglicherweise nicht nur durch die Stärke der Depolarisation vermittelt ist, sondern durch einen zusätzlichen direkten Einfluss auf das Öffnungsverhalten der L-Typ Calciumkanäle.

Um dies zu beantworten, wurde die Charakterisierung spannungsabhängiger Calciumkanäle als neue Messmethode etabliert. Im *Voltage Clamp*-Modus und unter Bedingungen, die die in β -Zellen vorherrschenden und bei diesen Messungen störenden Kaliumströme unterdrücken sollten, wurden unter Einsatz eines Stimulationsprotokolls mit schrittweise zunehmenden Depolarisationspulsen Strom-Spannungs-Kennlinien aufgezeichnet. Dabei wurde unter Kontrollbedingungen

zunächst die für L-Typ Kanäle bekannte V-förmige Kurve mit einem maximalen Einwärtsstrom, also einer maximalen Kanalaktivierung bei etwa 0 mV registriert (Göpel et al. 1999).

Die Zugabe von Bay K verstärkte diesen Einstrom deutlich, ohne dabei die grundsätzliche Form der Kurve zu beeinflussen. Dies entspricht den beschriebenen Effekten von Bay K, wonach es durch direkte Interaktion mit L-Typ Kanälen deren Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht (Lebrun and Atwater 1985; Nowicky et al. 1985).

Die Wiederholung dieser Versuche mit 40 mM KCl anstatt Bay K führte jedoch zu keinem signifikanten Anstieg des Calciumeinstroms. Eine direkte agonistische Wirkung auf die L-Typ Kanäle konnte somit nicht nachgewiesen werden. Eine indirekte Beeinflussung, die unter den Bedingungen des *Voltage Clamps* möglicherweise unterdrückt wird, kann dadurch aber auch nicht ausgeschlossen werden.

So depolarisiert 40 mM KCl die β -Zellen unter nicht-*Voltage-Clamp*-Bedingungen dauerhaft auf ein Niveau um -20 mV, wodurch sich ein spezifisches elektrisches Feld ausbilden und auf diese Weise die Aktivität der spannungsabhängigen Calciumkanäle modifizieren könnte. Im Rahmen des genutzten Stimulationsprotokolls werden die β -Zellen dagegen auf ein Haltepotential von -70 mV geklemmt, was nur von den 100 ms dauernden Depolarisationspulsen unterbrochen wird. Würde man die Zellen stattdessen auf -20 mV klemmen, um die Depolarisation mit 40 mM KCl zu imitieren, wäre es aufgrund der Inaktivierungsmechanismen wiederum nicht möglich die charakteristischen Aktivierungskurven aufzuzeichnen. In diesem speziellen Fall würden solche Messungen aber vermutlich die für die Interpretation der Effekte der Kaliumdepolarisation relevanteren Ergebnisse liefern.

Für die selektive Untersuchung des Öffnungsverhaltens einzelner Ionenkanäle unter Einfluss verschiedener Substanzen sind Messungen im *Voltage Clamp* nach wie vor von großer Bedeutung. Bei der Betrachtung gesamtzellulärer Zusammenhänge ist diese Methode jedoch von begrenztem Wert, da sie notwendigerweise den Funktionszustand, in dem die Kanäle arbeiten, vollständig definiert.

Eine nennenswerte Beobachtung dieser Messungen war die heterogene Entwicklung des Calciumeinstroms in Anwesenheit von 40 mM KCl. So konnte in einer Versuchsserie von neun Versuchen im Mittel keine signifikante Veränderung des Einstroms festgestellt werden, was auch für drei der neun durchgeführten Versuche zutraf. Bei vier weiteren Versuchen war ein teilweise transienter Anstieg des Calciumeinstroms zu verzeichnen. In den übrigen zwei Versuchen nahm der

Einwärtsstrom dagegen leicht ab. Dies kann aufgrund der Reversibilität nach Auswaschen der hohen Kaliumkonzentration jedoch nicht mit einem *Run down*-Effekt erklärt werden. Unter *Run Down* versteht man die zeitabhängige Abnahme des Stroms durch einen spannungsabhängigen Kanal während eines *Voltage Clamp*-Experiments. Diese Beobachtungen legen die Notwendigkeit nahe bei elektrophysiologischen Methoden mit höheren Versuchszahlen zu arbeiten. Das trifft insbesondere bei Substanzen mit schwachen, aber trotzdem signifikanten Effekten zu.

Da der veränderte Calciumeinstrom bei starker Kaliumdepolarisation nicht auf einem direkten Effekt auf spannungsabhängige Calciumkanäle beruht, haben wir nach weiteren möglichen Targets gesucht, die durch die Kaliumdepolarisation aktiviert werden und so zu dem verstärkten Calciumeinstrom beitragen könnten.

Die Gruppe um Pizarro-Delgado und Tamarit-Rodriguez beschäftigte sich zu der Zeit mit einem bisher wenig berücksichtigten Protein der β -Zellen: dem Cx36-Hemichannel, also ungekoppelten, aber physiologisch aktiven Connexonen (siehe dazu Kap. 1.2.2). In mehreren Veröffentlichungen wiesen sie einen Einfluss dieser Kanäle auf den ATP-Gehalt und die Insulinsekretion nach. Die Aktivierung erfolgte dabei v.a. mit hohen Kaliumkonzentrationen (70 mM), aber auch niedrigere Konzentrationen (15 und 30 mM) führten bereits zu einem konzentrationsabhängigen ATP-Verlust (Pizarro-Delgado et al. 2014, 2015, 2016). Zusammengefasst sind Connexin-Hemichannels Kanäle, die unter Einfluss starker Depolarisation bzw. hoher Kaliumkonzentrationen öffnen, sowohl für ATP als auch für Calciumionen durchlässig sind und so einen Einfluss auf die Insulinsekretion haben. Aufgrund dieser Charakteristik sollte eine mögliche Beteiligung der Hemichannels an den insulinotropen Mechanismen der Kaliumdepolarisation untersucht werden.

5.2 Mefloquin beeinflusst die Insulinsekretion durch Blockade elementarer Strukturen der β -Zelle

Untersuchungen an Neuronen zeigten, dass das Malariamittel Mefloquin im nano- bis niedrigen mikromolaren Bereich *gap junctions* der Subtypen Cx36 und Cx50 hemmt. Da zur Hemmung anderer *gap junctions* deutlich höhere Konzentrationen nötig waren und in den untersuchten Neuronen keine unspezifischen Nebeneffekte beobachtet wurden, wurde es als spezifisches Mittel zur Untersuchung dieser Subtypen empfohlen (Cruikshank et al. 2004). Inzwischen hat sich der Einsatz von Mefloquin nicht nur bei der Untersuchung von Cx36-*gap junctions* sondern ebenfalls von Cx36-Hemichannels etabliert (Pizarro-Delgado et al. 2014).

5.2.1 K_{ATP} -Kanalblockade durch Mefloquin

Aufgrund von Hypoglykämien, die unter Malariatherapie beobachtet wurden, wurden bereits verschiedene Substanzen hinsichtlich einer möglichen insulinotropen Wirkung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Chinolin-basierte Malariamittel, u.a. auch Mefloquin, K_{ATP} -Kanäle blockieren und so zu einer deutlichen Steigerung der Insulinsekretion beitragen (Bokvist, Rorsman, and Smith 1990; Gribble et al. 2000; Harats, Ackerman, and Shalit 1984).

Diese veröffentlichten Ergebnisse ließen Zweifel an der Spezifität des Mefloquins für Connexone entstehen. In den von Gribble et al. (2000) durchgeführten Versuchen wurde jedoch die Insulinsekretion Langerhans'scher Inseln nach zwei bis sechs Tagen der statischen Inkubation sowie die Aktivität von in *Xenopus*-Oozyten exprimierten, β -Zell-spezifischen K_{ATP} -Kanälen ($K_{ir6.2/SUR1}$) gemessen. Diese Versuche sind folglich nicht geeignet, um akute Effekte auf die Sekretion zu beobachten oder das Verhalten der Kanäle *in situ* widerzuspiegeln. Um sich hier Klarheit zu verschaffen, wurde die Wirkung von Mefloquin auf primäre β -Zellen und intakte Inseln mithilfe von elektrophysiologischen, mikrofluorimetrischen und Perifusionsmessungen untersucht.

In den von uns durchgeführten Messungen des Membranpotentials einzelner β -Zellen resultierte der K_{ATP} -Kanal-hemmende Effekt in einer typischen Depolarisation. Diese war in Konzentrationen, die üblicherweise zur Cx36-Blockade genutzt werden (25–50 μ M), vergleichbar mit der durch Tolbutamid, dem klassischen Vertreter der K_{ATP} -Kanal-blockierenden Sulfonylharnstoffe, in maximal effektiver Konzentration (Zünlker et al. 1988). Die Wirkung setzte allerdings umso später und langsamer ein je niedriger die

Konzentration war, wodurch die Erstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wesentlich erschwert wurde.

Es gab dabei einen besonders auffälligen Unterschied zwischen Tolbutamid und Mefloquin: Anders als bei dem Sulfonylharnstoff kam es bei Mefloquin nach Erreichen des Plateaupotentials nicht zur Ausbildung der klassischen Aktionspotentiale. Dafür war das Plateaupotential mit Schwankungen von etwa 10 mV recht unruhig. Letzteres könnte mit einer Hemmung weiterer Kaliumkanäle begründet werden. So wurde z.B. dem Kaliumkanal TASK-1 (*two-pore-domain acid-sensitive potassium channel*) kürzlich eine wichtige Rolle in der Feinjustierung des Plateaupotentials zugeschrieben (Dadi, Vierra, and Jacobson 2014). Das Ausbleiben der Aktionspotentiale hingegen musste mit einer Blockade des für den Aktionspotentialaufstrich verantwortlichen Calciumeinstroms durch L-Typ Calciumkanäle zusammenhängen (Göpel et al. 1999; Henquin and Meissner 1984). Diese Vermutung wurde durch eine Publikation unterstützt, in der die Blockade der kardialen L-Typ Calciumkanäle als Ursache für einen negativ inotropen Effekt von Mefloquin postuliert wurde (Coker et al. 2000).

5.2.2 Hemmung spannungsgesteuerter Calciumkanäle

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der Effekt von Mefloquin auf bestehende Tolbutamid-induzierte Aktionspotentiale getestet und mit dem Effekt des hochselektiven und -potenten L-Typ Blockers Nisoldipin verglichen (Knorr 1995; Missan et al. 2003). Trotz seiner bereits hohen Spezifität für L-Typ Kanäle gibt es Hinweise auf Nebeneffekte des bisher von uns genutzten Nifedipins z.B. auf nikotinische und muskarinische (m_1+m_3) ACh-Rezeptoren (Kwon and Triggle 1991; López et al. 1993). Da u.a. ein relevanter Einfluss der m_3 -Rezeptoren auf die Funktion der β -Zellen bekannt ist (Gautam et al. 2007), haben wir hier auf das höher potente und daher in niedrigeren Konzentrationen einsetzbare Nisoldipin zurück gegriffen, um solche verfälschenden Wirkungen möglichst auszuschließen.

Tatsächlich kamen die Tolbutamid-induzierten Aktionspotentiale bei Zugabe des Mefloquins vollständig zum Erliegen, während das Plateaupotential erhalten blieb; genauso wie unter Einfluss von Nisoldipin. Bei der Gegenprobe, bei der die Zellen erst mit Mefloquin und dann zusätzlich mit Tolbutamid umströmt wurden, blieben die Aktionspotentiale ganz aus. Dadurch konnte ein zeitabhängiges Schwinden der Aktionspotentiale ausgeschlossen werden.

Auch hier wurde in *Voltage Clamp*-Messungen das Öffnungsverhalten der L-Typ Kanäle untersucht. Die dabei registrierten Strom-Spannungs-Kennlinien unter Kontrollbedingungen entsprachen mit einem maximalen Calciumeinstrom bei etwa 0 mV dem zuvor beschriebenen Öffnungsverhalten der L-Typ Calciumkanäle (Göpel et al. 1999; Rorsman and Trube 1986). Die Ergebnisse anderer Gruppen zeigen zwar eine leicht abweichende Öffnungscharakteristik mit einem Aktivierungsmaximum im positiven Bereich (+10—+20 mV), dort wurde allerdings auch mit leicht abweichenden Methoden gearbeitet; u.a. diente Barium anstatt Calcium als Ladungsträger (Tang et al. 2013; Vignali et al. 2006).

Bei unseren Messungen trat außerdem das Umkehrpotential bei vergleichsweise niedrigen Spannungen auf (etwa +25 mV). Das bedeutet, dass ab diesem Potential anstatt des Einwärtsstroms ein Auswärtsstrom zu messen war. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen: Einerseits wurde auf eine Substitution des intrazellulären Kaliums durch Cesium oder N-Methyl-D-Glucamin zur Unterdrückung von Kaliumauswärtsströmen verzichtet. Dafür wurde der Pipettenlösung für die gezielte Blockade der K_{ATP} -Kanäle Na_2ATP zugesetzt, während die Badlösung den unspezifischen Kaliumkanalblocker TEA enthielt. Eine gewisse Restaktivität spannungsgesteuerter Kaliumkanäle, die bei positiven Membranpotentialen aktivieren, wäre dennoch möglich.

Andererseits ist der gemessene Strom kein reiner Calciumstrom durch L-Typ-Kanäle, sondern die Summe sämtlicher Ionenströme. Davon ausgehend, dass Nisoldipin in der genutzten Konzentration (1 μM) ausschließlich L-Typ Calciumkanäle blockiert, wurde durch Subtraktion des Reststroms in Anwesenheit von Nisoldipin von der Kontrollkurve eine Netto-Kurve für den reinen L-Typ Strom erstellt. Die resultierende Kurve entsprach den typischen Darstellungen mit einem Umkehrpotential bei +50 mV (Göpel et al. 2004; Vignali et al. 2006).

Die Anwesenheit von Mefloquin bewirkte eine starke, konzentrationsabhängige Reduktion des Einwärtsstroms, wobei der Effekt von 25 und 50 μM Mefloquin signifikant stärker war als der von Nisoldipin. Aufgrund der nachgewiesenen Spezifität von Nisoldipin für die L-Typ Kanäle kann man davon ausgehen, dass Mefloquin darüber hinaus weitere spannungsabhängige Calciumkanäle z.B. vom P/Q- oder R-Typ hemmt (Vignali et al. 2006).

Mefloquin führte jedoch nicht bloß zu einer vollständigen Hemmung des Einwärtsstroms. Teilweise wurden sogar positive Werte der Stromantwort registriert, was in der *Voltage Clamp*-Konfiguration ein Ausdruck sowohl auswärts gerichteter

Ströme mit positiver Ladung als auch einwärts gerichteter Ströme negativ geladener Teilchen sein kann. Ein Problem dieser Messungen ist jedoch, dass vermeintliche Leckströme, die bereits beim Haltepotential von -70 mV registriert werden (z.B. Undichtigkeiten zwischen Pipettenspitze und Zellmembran), rechnerisch kompensiert werden. Insofern kann sich durch diese Anpassung die Lage des Nullstroms verändern, wodurch ein artifizieller Auswärtsstrom registriert wird. Anhand von kontinuierlichen *Voltage Clamp*-Versuchen ohne Leckstromkompensation konnten wir ausschließen, dass durch Mefloquin auswärts gerichtete Ströme aktiviert werden.

In weiteren *Voltage Clamp*-Versuchen antagonisierte Mefloquin den in Anwesenheit des spezifischen L-Typ Kanalöffners Bay K etwa verdoppelten Calciumeinstrom vollständig. Dies untermauert unsere Behauptung, dass Mefloquin in Konzentrationen, die für die Blockade von Cx36-Hemichannels zum Einsatz kommen, ein effektiver Hemmstoff spannungsgesteuerter Calciumkanäle, insbesondere der L-Typ Calciumkanäle ist.

Entsprechend müsste Mefloquin auch einen hemmenden Effekt auf die cytosolische Calciumkonzentration haben. Diese Vermutung konnte mithilfe von mikrofluorimetrischen Messungen bestätigt werden, bei denen die Anwesenheit von Mefloquin den Tolbutamid-induzierten Anstieg der Calciumkonzentration verhinderte. Auffällig war hier ein vorübergehender, leichter Anstieg der Calciumkonzentration nach Zugabe des Mefloquins. Dieser kann aber anhand der unterschiedlichen Reaktionskinetiken erklärt werden. Wie bereits bei der K_{ATP} -Kanalblockade beschrieben, entfaltete das Mefloquin auch seine Calciumkanal-blockierende Wirkung stark verzögert. Die Depolarisation durch eine etwas schneller einsetzende K_{ATP} -Kanalblockade würde so einen beginnenden Calciumanstieg herbeiführen, welcher bald darauf von der Ca^{2+} -Kanalblockade beendet würde.

Die dargelegten Ergebnisse weisen eindeutig auf eine hemmende Wirkung des Mefloquins auf spannungsgesteuerte Calciumkanäle hin; ein Effekt, welcher von Pizarro-Delgado et al. (2014) für unwahrscheinlich erklärt wurde. Diese Vermutung basierte jedoch auf Messungen, bei denen mit 250 μ M Mefloquin eine starke Sekretionssteigerung und eine Abnahme des Insulingehalts der β -Zellen um 40 % registriert wurde, nicht aber bei niedrigeren Konzentrationen, die für gewöhnlich im experimentellen Bereich zum Einsatz kommen (z.B. 50 μ M). Zudem hatte 50 μ M Mefloquin nur einen „marginalen Effekt“ auf die mit 70 mM KCl induzierte Sekretion (Reduktion um 30 %). Die Erkenntnisse des vorangegangenen Diskussionskapitels 5.1 legen jedoch nahe, dass die so ausgelöste Sekretion nicht mehr mit einer

physiologischen Stimulation gleichgesetzt werden kann. Eine hemmende Wirkung auf spannungsgesteuerte Calciumkanäle kann auf Grundlage jener Ergebnisse also nicht generell ausgeschlossen werden.

5.2.3 Wirkung auf die Insulinsekretion

Zu guter Letzt ist für die Wirkung pharmakologischer Substanzen auf die pankreatischen β -Zellen ein Parameter, auf den sowohl die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle als auch der spannungsgesteuerten Calciumkanäle Auswirkungen hat, von besonderem Interesse: die Insulinsekretionsrate.

Die Wirkung vom Mefloquin auf die Sekretion intakter Inseln wurde zunächst unter Einsatz rein depolarisierender Substanzen untersucht. Der beschriebene leichte Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration bei Zugabe von Mefloquin allein war nicht stark genug, die basale Sekretionsrate zu erhöhen. Jedoch führte es in Anwesenheit von Tolbutamid zu einem Verschluss möglicherweise noch letzter offener K_{ATP} -Kanäle, wodurch die Tolbutamid-induzierte Sekretion vorübergehend ein wenig verstärkt wurde. Wie zu erwarten war, überwog jedoch anschließend der calciumhemmende Effekt und die Sekretion nahm im Vergleich zur Kontrolle deutlich ab.

Auch auf die Kalium-induzierte Sekretion hatte Mefloquin einen nachhaltig hemmenden Effekt. Die rein depolarisationsinduzierte Sekretion hat zwar eine klassische erstphasige Charakteristik, d.h. nach einem starken initialen Anstieg, fällt sie automatisch schnell wieder auf deutlich niedrigere Werte ab, eine gewisse Restsekretion bleibt aber bestehen (Morsi et al. 2020). Unter Einfluss von Mefloquin wurde die Kalium-induzierte Sekretion jedoch auf basale Werte gesenkt und das, obwohl der simultan registrierte, enorme Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration nur etwa um die Hälfte reduziert wurde.

Außerdem konnte mit 40 mM KCl nach einer 30-minütigen Umströmung mit 50 μ M Mefloquin und einer anschließenden 20-minütigen Auswaschphase kein Sekretionsanstieg ausgelöst werden. Dies ist im Einklang mit der unvollständigen Reversibilität der Calciumhemmung und dem generell trägen Verhalten des Mefloquins, welche in den Kinetikstudien beobachtet wurden.

Besonders interessant ist jedoch der Einfluss vom Mefloquin auf die physiologische, Glucose-induzierte Sekretion. Diese wurde ebenfalls simultan mit der cytosolischen

Calciumkonzentration vermessen. Das Mefloquin wurde hinzugegeben, nachdem die Inseln für 20 min mit 30 mM Glucose umströmt worden waren; also zu einem Zeitpunkt, zu dem etwa die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion beginnt (Morsi et al. 2020). Der beginnende Neuanstieg von Calciumkonzentration und Sekretionsrate konnte in den ersten Minuten der Mefloquinzufuhr aufgrund der verzögerten Kinetik noch beobachtet werden. Anders als bei Tolbutamid und KCl führte Mefloquin hier aber nicht zu einer anschließenden Abnahme, sondern stabilisierte beide Parameter auf dem erhöhten Level. Auch wenn sowohl der Glucose-stimulierte Calciumanstieg als auch die daraus resultierende Sekretion schwächer ausfallen als bei der Kalium- oder Tolbutamid-induzierten Depolarisation (siehe in dieser Arbeit oder auch bei Morsi et al. 2020), so war Mefloquin hier dennoch nicht in der Lage diese Funktionen zu blockieren. Es scheint, als wären die Bedingungen in einer Glucose-stimulierten Zelle anders, wodurch auch die Wirkung vom Mefloquin auf die Ionenkanäle anders ausfällt.

Tatsächlich sind diese „anderen Bedingungen“ in Anwesenheit eines Nährstoffstimulus ein großes Thema bei den aktuellen Bestrebungen der Insulinsekretionsforschung. Es ist bekannt, dass bestimmte Produkte des Glucosestoffwechsels zu einer Amplifizierung der Insulinsekretion beitragen (Henquin 2000). Allerdings konnten bisher weder der genaue Mechanismus noch konkrete Metabolite sicher identifiziert werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass während des Glucosemetabolismus vermehrt gebildetes Acetyl-CoA aus den Mitochondrien ausgeschleust wird und die Amplifizierung über Acetylierung cytosolischer Proteine vermittelt (Panten et al. 2016). Auf diese Weise könnte es auch die Empfindlichkeit der Ionenkanäle gegenüber dem Mefloquin beeinflussen.

Damit ließe sich auch die zunächst paradox wirkende Beobachtung von Davis et al. (1996) begründen, die in einer Studie an gesunden Probanden unter konventioneller prophylaktischer Therapie mit Mefloquin eine relative Hyperinsulinämie sowie eine Blutzuckersenkung um durchschnittlich 0,5 mmol/l nachwiesen.

Ein weiterer Effekt des Mefloquins auf den cytosolischen Calciumspiegel wurde von Dow et al. (2003) vorgestellt. Demnach bewirkt Mefloquin zunächst die Freisetzung interner Calciumspeicher aus dem ER, woraufhin ein kapazitiver Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum induziert wird. Als Mechanismus wurde hierfür eine Akkumulation und Einlagerung der Mefloquinmoleküle in der Lipiddoppelschicht vorgeschlagen, wodurch die Membran durchlässiger für Calciumionen werden könnte (Caridha et al. 2008). Unterstützt wird diese Hypothese von Zidovetzki et al. (1990), die

eine Einlagerung vom Mefloquin in Lipiddoppelschichten und infolgedessen eine Beeinträchtigung der gleichmäßigen Lipidkettenanordnung nachwiesen. Dies wiederum wäre eine plausible Erklärung für die starke und anhaltende Interaktion mit den Ionenkanälen.

Die Überlegung, dass Connexinhemichannels in den Mechanismus der KCl-induzierten Insulinsekretion involviert sind, bleibt ein interessanter Ansatzpunkt und sollte weiter verfolgt werden. So wäre die Öffnung der Hemichannels bei starker Kaliumdepolarisation und der damit einhergehende ATP-Verlust eine mögliche Ursache für die von Willenborg et al. (2012) beschriebene Desensibilisierung der Insulinsekretion. Widersprechen würde dem allerdings, dass die Desensibilisierung bei Reduktion der extrazellulären Calciumkonzentration weniger stark ausfiel. Im Allgemeinen führt eine Verringerung der Calciumkonzentration jedoch ebenfalls zur Hemichannelöffnung und müsste damit eine Verstärkung dieses Effektes zur Folge haben (Srinivas et al. 2006).

Auch besteht kein Zweifel daran, dass Mefloquin ein effektiver Hemmstoff dieser Kanäle ist. Unsere Ergebnisse liefern allerdings den unbestreitbaren Beleg, dass es in dem gleichen Konzentrationsbereich entscheidende Strukturen der β -Zellfunktion beeinflusst, wodurch es ganz offensichtlich für diesen konkreten Einsatz ungeeignet ist. Vielmehr führt es uns durch die unterschiedliche Beeinflussung der Depolarisations- und der Nährstoffinduzierten Sekretion die Unzulänglichkeiten etablierter, experimenteller Methoden vor Augen und wirft dadurch am Ende mehr Fragen auf als es beantwortet.

5.3 Der K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid hemmt unter physiologienahen Bedingungen die Glucose-induzierte Insulinsekretion durch Störung der Mitochondrienfunktion

Als drittes pharmakologisches Werkzeug in der Insulinsekretionsforschung wurde der Effekt des K_{ATP} -Kanalöffners Diazoxid auf bestimmte Vorgänge der β -Zellen untersucht.

Diazoxid wird standardmäßig in Kombination mit hohen Kaliumkonzentrationen bei der Erforschung der nährstoffabhängigen, metabolischen Amplifikation eingesetzt (Gembal et al. 1992; Kibbey et al. 2007). Während Diazoxid alleine die Glucose-induzierte Insulinsekretion hemmt, indem es die K_{ATP} -Kanäle öffnet und so die obligatorische Membrandepolarisation verhindert, bleibt die Sekretion bei dieser Kombination dank der Kaliumdepolarisation erhalten. Die Glucose kann unter diesen Bedingungen ausschließlich ihre amplifizierende Wirkung entfalten.

5.3.1 Schwacher Effekt auf Membranpotential und cytosolische Calciumkonzentration, aber starke Hemmung der Insulinsekretion

Wir wollten den Effekt von Diazoxid auf die β -Zellen unter vergleichsweise physiologienahen Bedingungen betrachten. So wurde ausschließlich mit Kaliumchlorid in der Konzentration 15 mM gearbeitet anstatt der oft genutzten 30–40 mM. Denn wie eine Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe demonstriert, kommt diese Konzentration sowohl in dem erreichten Plateaupotential als auch im cytosolischen Calciumlevel dem Effekt von 20 mM Glucose besonders nahe (Belz et al. 2014). Mit dieser Glucosekonzentration wird die maximal stimulierbare Insulinsekretion ausgelöst, weshalb sie in experimentellen Studien oft zum Einsatz kommt. Dabei liegt sie deutlich über physiologisch erreichbaren Plasmaspiegeln. Die Bandbreite der zur Stimulation genutzten Konzentrationen reicht von 11–30 mM (Hodson et al. 2013; Pizarro-Delgado et al. 2016; Rorsman and Ashcroft 2018; Zawalich, Yamazaki, and Zawalich 2008). Um auch hier möglichst physiologienah zu bleiben, entschieden wir uns für die relativ niedrige, aber immer noch stimulatorische Konzentration von 10 mM.

Unter diesen Bedingungen beobachteten wir, dass Diazoxid in gängiger Konzentration (250 μ M) die von der Kombination aus 15 mM KCl und 10 mM Glucose ausgelösten Aktionspotentiale vollständig zum Erliegen brachte. Dieser Effekt war vergleichbar mit dem eines klassischen Calciumkanalöffners und lässt auf den ersten Blick vermuten,

dass Diazoxid wie das im vorangegangenen Kapitel besprochene Mefloquin eine Calciumkanal-blockierende Nebenwirkung hat.

Bei genauerer Überlegung, ist es aber ein logischer Effekt, da die Aktionspotentiale – wie zu Beginn des Kapitels zur Kaliumdepolarisation 5.1.1 bereits erläutert wurde – von sich abwechselnden Einwärts- und Auswärtsströmen von Calcium- und Kaliumionen geformt werden. Die Kaliumauswärtsströme kommen dabei nur bei starker Depolarisation durch Öffnung spannungsabhängiger Kaliumkanäle zustande, die sich bei Repolarisation schnell wieder schließen. Wird der Glucose-abhängige Verschluss der K_{ATP} -Kanäle vom Diazoxid verhindert, bleibt die Membran dauerhaft durchlässig für Kalium. So wird der Calciumeinwärtsstrom durch gleichzeitig ausströmende Kaliumionen kaschiert und Aktionspotentiale sind nicht mehr erkennbar.

Das durch die Kaliumdepolarisation erreichte Plateaupotential und damit der *triggering* Effekt blieben in Anwesenheit von Diazoxid aber erhalten und auch die amplifizierende Wirkung der Glucose sollte theoretisch nicht gehemmt werden. Demnach müsste man davon ausgehen, dass die Insulinsekretion ebenfalls erhalten bleibt, genauso wie es bei höheren Konzentrationen von KCl und Glucose der Fall ist. Messungen der Sekretionsrate zeigten jedoch, dass die Insulinsekretion unter diesen Bedingungen vollständig durch Diazoxid gehemmt wurde. Zudem trat auch hier das bereits beschriebene Phänomen auf, dass 15 mM KCl bei basaler Glucose trotz der theoretisch hinreichenden Depolarisation einen nur sehr schwachen und transienten Sekretionsanstieg bewirkte (Belz et al. 2014; Willenborg et al. 2012).

Unter gleichen Bedingungen konnte ein sehr starker, aber ebenfalls transientser Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration beobachtet werden, der anschließend zwar nicht auf das basale, aber ein deutlich niedrigeres Level abfiel. Nach zusätzlicher Erhöhung der Glucose auf 10 mM wurde das Calciumlevel nochmals leicht angehoben, was einen enormen Anstieg der Insulinsekretion zur Folge hatte. Die Zugabe des Diazoxids bewirkte anschließend eine Abnahme der Calciumkonzentration, was ein möglicher Grund für die Reduktion der Insulinsekretion sein könnte. Betrachtet man allerdings den zwar deutlich stärkeren, aber nur schwach sekretorisch wirksamen initialen Peak mit 15 mM KCl, wird offensichtlich, dass die Insulinsekretion zwar unbestreitbar vom Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration abhängig ist, es aber keine direkte Korrelation zwischen dem Calciumlevel und der Sekretionsrate gibt. Auf dieser Grundlage kann die Senkung des Calciumlevels allein nicht als sichere Erklärung für diese dramatische Hemmung der Insulinsekretion herangezogen werden.

5.3.2 *Beeinflussung der Mitochondrienfunktion*

Die Frage, auf welche Weise das Diazoxid die β -Zellfunktion so beeinflusst, dass die Insulinsekretion vollständig unterdrückt wird, blieb also bestehen.

Einen Hinweis gab die Veröffentlichung von Grimmsmann und Rustenbeck (1998). Es konnte nachgewiesen werden, dass Diazoxid einen direkten Effekt auf die Mitochondrien hat, indem es das mitochondriale Membranpotential senkt und den Sauerstoffverbrauch sowie die ATP-Bildung substratabhängig hemmt. Die Substratabhängigkeit ließ darauf schließen, dass konkret der Komplex II der Atmungskette betroffen ist.

Zunächst wurden die in der genannten Arbeit durchgeführten mikrofluorimetrischen Messungen des mitochondrialen Membranpotentials einzelner β -Zellen aufgegriffen und mit unseren NMRI-Mäusen wiederholt, da dort Zellen eines anderen Maus-Modells genutzt wurde. Auch bei uns hatte das Diazoxid eine konzentrationsabhängige, depolarisierende Wirkung auf die Mitochondrien.

Dieser Effekt wurde mit dem von Natriumazid verglichen, einem Hemmer der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV der Atmungskette, Stannard und Horecker 1948). Da die Cytochrom-c-Oxidase den elementaren Schritt der Atmungskette, nämlich die Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff und dessen Reduktion zu Wasser, katalysiert, führt Natriumazid zu einem Stau in der Elektronentransportkette. Auf diese Weise hemmt es den Aufbau des Protonenpumpengradienten nicht nur direkt am Komplex IV, sondern auch an den vorangestellten Komplexen der Atmungskette und ist somit in seiner Wirkung mit einem Entkoppler der Atmungskette vergleichbar. In unserem Vergleich der Wirkungen auf das mitochondriale Membranpotential war das Diazoxid mehr als halb so effektiv wie das stark depolarisierende Natriumazid in maximal effektiver Konzentration.

Der Effekt vom Diazoxid auf die Mitochondrien sollte anschließend mithilfe von Messungen der Adeninnukleotide verifiziert werden. Es konnte eine leichte Abnahme der ATP/ADP-Ratio festgestellt werden, wenn in Anwesenheit von 10 mM Glucose und 15 mM KCl Diazoxid hinzugefügt wurde. Dies unterstützt grundsätzlich die atemungskettenhemmende Wirkung, der Wert war jedoch nicht signifikant.

Ein Grund dafür könnte in der Methodik der Nukleotidbestimmung liegen. Es wurde der gesamte ATP-Gehalt ganzer Inseln vermessen. Dabei kann keine Differenzierung des ATP-Gehaltes der verschiedenen Zellkompartimente oder des cytosolischen ATP-

Gehaltes erfolgen, wodurch eine geringe Veränderung der mitochondrialen ATP-Produktion möglicherweise nicht erkannt wird.

Ein weiterer Punkt, der nicht vernachlässigt werden sollte, ist die unterschiedliche Vorbehandlung der untersuchten Zellen bzw. Gewebe. Während in den vorangegangenen Versuchen mit kultivierten Präparaten gearbeitet wurde, wurden die Adeninnukleotide frisch isolierter Pankreasinseln bestimmt. Unsere Arbeitsgruppe wies aber inzwischen nach, dass die Zellkultur einen deutlichen Einfluss auf die mitochondriale Energetik der Inselzellen hat (Morsi et al. 2020). Für eine sicherere Aussage, sollte dieser Versuch also noch einmal mit kultivierten Inseln wiederholt werden.

Der Verdacht, dass das Diazoxid über eine Hemmung der Mitochondrienfunktion die Insulinsekretion beeinflusst, bleibt. Bisher nicht veröffentlichte TIRF-mikroskopische (*total internal reflection fluorescence*) Aufnahmen zeigen, dass sich Mitochondrien im membrannahen Raum in direkter Nachbarschaft zu reifen Sekretgranula befinden. Hat diese Nachbarschaft normalerweise einen fördernden Effekt auf die Freisetzung des Insulins, so könnte schon eine schwache Hemmung der Mitochondrientätigkeit in einem sensiblen, stimulatorischen Bereich (wie z.B. geringen, aber physiologienahen, Glucose- und KCl-Konzentrationen) einen messbaren Effekt auf die Sekretion haben. Diese Annahme wird durch weitere Publikationen zum Thema Mitochondrien und deren Einfluss auf die Insulinsekretion unterstützt, die aus den Arbeitsgruppen um Orian Shirihai und Simone Baltrusch stammen (z.B. Baltrusch 2016; Stiles and Shirihai 2012). Griesche et al. (2019) postulieren sogar einen konkreten Einfluss der membrannahen Mitochondrien auf die Insulinsekretion, indem sie lokal die Calciumkonzentration regulieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die metabolische Amplifikation ist ein Begriff, mit dem ein derzeit noch ungeklärter Signalweg bezeichnet wird, durch den die Nährstoff-induzierte Insulinsekretion stärker und anhaltender ist als die Insulinsekretion, die durch rein depolarisierende Stimuli ausgelöst wird. Die Aufklärung ihrer genauen Mechanismen und Botenstoffe hat aber bis heute noch nicht zu einem Konsens geführt und ist daher ein wichtiges Motiv, die Stimulus-Sekretionskopplung in der pankreatischen β -Zelle weiter aufzuklären.

Ein klassisches Protokoll zur Untersuchung der metabolischen Amplifikation ist die Vorbehandlung mit der Kombination aus hoher Kaliumkonzentration, die eine Depolarisation der β -Zellen bewirkt, und Diazoxid, welches die K_{ATP} -Kanäle auch nach Zugabe eines Nährstoffstimulus im geöffneten Zustand hält. Allerdings wurden sowohl unter Einfluss der Kaliumdepolarisation als auch von Diazoxid problematische Phänomene wie z.B. ein verändertes Sekretionsmuster oder eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung dieser pharmakologischen Werkzeuge auf die elementaren Vorgänge der Stimulations-Sekretions-Kopplung an primären β -Zellen und Langerhans'schen Inseln untersucht, um herauszufinden, welche Mechanismen hinter diesen Phänomenen stecken: Die Aktivität der Mitochondrien wurde anhand des Adeninnucleidgehalts und des mitochondrialen Membranpotentials bestimmt. Mithilfe der Patch-Clamp-Technik wurde zum einen das Membranpotential der Zellen registriert, zum anderen wurde in Membranstrommessungen gezielt das Verhalten spannungsabhängiger Calciumkanäle beobachtet. Die Entwicklung der cytosolischen Calciumkonzentration wurde mikrofluorimetrisch vermessen. Abschließend wurde das Ergebnis dieser einzelnen Vorgänge, nämlich der Einfluss auf die Insulinsekretionsrate betrachtet.

Aufgrund der Umwandlung der Calciumaktionsströme in einen kontinuierlichen Einwärtsstrom unter Einfluss von 40 mM Kalium wurde eine direkte Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle vermutet. Dieser Effekt konnte mithilfe selektiver Messungen des Calciumeinstroms nicht bestätigt werden. Da der *Voltage Clamp* jedoch elektrophysiologische Bedingungen vorgibt, die definitiv nicht den Bedingungen einer Zelle mit frei regulierbarem Membranpotential entsprechen, konnte diese Hypothese auch nicht eindeutig widerlegt werden. Wahrscheinlicher ist aber eine indirekte Beeinflussung durch eine Veränderung der Funktionsbedingungen dieser Kanäle.

Ein möglicher weiterer Mechanismus, der dem verstärkten Calciumeinstrom zugrunde liegen könnte, ist die depolarisationsabhängige Öffnung sogenannter Connexin-Hemichannels, die zu einer erhöhten Calciumpermeabilität der β -Zellen beitragen. Als pharmakologisches Mittel zur Untersuchung dieser Hemichannels hat sich in der Literatur das Antimalariamittel Mefloquin etabliert. Aber auch an der postulierten Spezifität für bestimmte Connexin-Subtypen gab es aufgrund von Hypoglykämien unter Mefloquintherapie gewisse Zweifel. Deshalb wurde in dieser Arbeit geprüft, ob Mefloquin einen Einfluss auf die Depolarisation der β -Zellen hat. Eine zuvor beschriebene blockierende Wirkung auf die K_{ATP} -Kanäle konnte zweifelsfrei bestätigt werden.

Die bei diesen Untersuchungen zu Tage getretenen Unterschiede zwischen Mefloquin und dem K_{ATP} -Kanalblocker Tolbutamid ließen zudem einen Einfluss auf spannungsabhängige Calciumkanäle vermuten. Tatsächlich konnte eine vollständige Hemmung dieser Kanäle durch Mefloquin nachgewiesen werden, die sich in einer Hemmung der depolarisationsinduzierten Insulinsekretion widerspiegelte. Im Unterschied zur rein depolarisationsinduzierten Insulinsekretion ließ sich die Hemmung der Sekretion als Antwort auf einen Glucosestimulus jedoch nicht zeigen. Aufgrund dieser vielfältigen (Neben-)Wirkungen ist Mefloquin für die Charakterisierung von Hemichannels offenbar ungeeignet, und das nicht nur in β -Zellen, sondern auch in anderen Geweben, in denen diese Strukturen eine Rolle spielen. Der bemerkenswerte Unterschied zwischen depolarisations- und Nährstoff-induzierter Sekretion ist ein weiterer Hinweis auf die Bedeutsamkeit der metabolischen Signale für die Regulation der Insulinsekretion.

Untersuchungen mit dem K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid, bestätigten dessen zusätzliche Wirkung einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials, was insbesondere für membrannahe Mitochondrien in der unmittelbaren Nachbarschaft reifer Insulingranula eine wichtige Rolle spielen könnte. Zudem zeigten sie, dass es infolgedessen unter physiologienahen Bedingungen – sprich verhältnismäßig niedrigen Glucose- und Kaliumkonzentrationen – die Glucose-induzierte Insulinsekretion hemmt.

Zusammengefasst zeichnen alle Untersuchungen ein eindeutiges Bild: das experimentelle Werkzeug „Kaliumdepolarisation“ imitiert mitnichten die erste Phase der Nährstoff-induzierten Insulinsekretion, da es anders als angenommen eben nicht ausschließlich eine Depolarisation der β -Zellen bewirkt, sondern den Calciumeinstrom über noch unbekannte Mechanismen verstärkt. Zudem hat auch der klassische Kombinationspartner Diazoxid zusätzliche Wirkungen auf die β -Zellfunktion, die

allerdings erst offensichtlich werden, wenn die Kaliumkonzentration auf mäßig depolarisierende Werte gesenkt wird.

Insgesamt wird deutlich, dass der Gebrauch dieses experimentellen Protokolls zur Untersuchung der metabolischen Amplifikation problematisch ist. Insofern scheint die Alternative, sämtliche K_{ATP} -Kanäle durch hohe Sulfonylharnstoffkonzentrationen zu schließen, günstiger. Die früher diskutierten zusätzlichen Wirkungen haben sich bisher nicht bestätigen lassen und das Ausmaß und Muster der Depolarisation entsprechen dem der Nährstoffstimuli.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aguilar-Bryan, L. and J. Bryan. 1999. "Molecular Biology of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels." *Endocrine Reviews* 20(2):101–35.
- Aguilar-Bryan, L., J. P. Clement, G. Gonzalez, K. Kunjilwar, A. Babenko, and J. Bryan. 1998. "Toward Understanding the Assembly and Structure of KATP Channels." *Physiological Reviews* 78(1):227–45.
- Arrojo e Drigo, R., Y. Ali, J. Diez, D. K. Srinivasan, P. O. Berggren, and B. O. Boehm. 2015. "New Insights into the Architecture of the Islet of Langerhans: A Focused Cross-Species Assessment." *Diabetologia* 58(10):2218–28.
- Ashcroft, F. M. and F. M. Gribble. 1998. "Correlating Structure and Function in ATP-Sensitive K⁺ Channels." *Trends in Neurosciences* 21(7):288–94.
- Ashcroft, S. J. H., C. J. Hedekov, and P. J. Randle. 1970. "Glucose Metabolism in Mouse Pancreatic Islets." *Biochemical Journal* 118(1):143–54.
- Baltrusch, S. 2016. "Mitochondrial Network Regulation and Its Potential Interference with Inflammatory Signals in Pancreatic Beta Cells." *Diabetologia* 59(4):683–87.
- Barg, S., J. Galvanovskis, S. O. Göpel, P. Rorsman, and L. Eliasson. 2000. "Tight Coupling between Electrical Activity and Exocytosis in Mouse Glucagon-Secreting Alpha-Cells." *Diabetes* 49(9):1500–1510.
- Beauvois, M. C., C. Merezak, J. C. Jonas, M. A. Ravier, J. C. Henquin, and P. Gilon. 2006. "Glucose-Induced Mixed [Ca²⁺]_i Oscillations in Mouse Beta-Cells Are Controlled by the Membrane Potential and the SERCA3 Ca²⁺-ATPase of the Endoplasmic Reticulum." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 290(6):C1503-11.
- Bechem, M. and M. Schramm. 1987. "Calcium-Agonists." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 19(SUPPL. 2):63–75.
- Belz, M., M. Willenborg, N. Görgler, A. Hamada, K. Schumacher, and I. Rustenbeck. 2014. "Insulinotropic Effect of High Potassium Concentration beyond Plasma Membrane Depolarization." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 306(6):E697-706.
- Benninger, R. K. P., M. Zhang, W. Steven Head, L. S. Satin, and D. W. Piston. 2008.

- "Gap Junction Coupling and Calcium Waves in the Pancreatic Islet." *Biophysical Journal* 95(11):5048–61.
- Bokvist, K., P. Rorsman, and P. A. Smith. 1990. "Block of ATP-Regulated and Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels in Mouse Pancreatic Beta-Cells by External Tetraethylammonium and Quinine." *The Journal of Physiology* 423:327–42.
- Bosco, D., M. Armanet, P. Morel, N. Niclauss, A. Sgroi, Y. D. Muller, L. Giovannoni, G. Parnaud, and T. Berney. 2010. "Unique Arrangement of α - and β -Cells in Human Islets of Langerhans." *Diabetes* 59(5):1202–10.
- Braun, M., R. Ramracheya, M. Bengtsson, Q. Zhang, J. Karanauskaite, C. Partridge, P. R. V Johnson, and P. Rorsman. 2008. "Voltage-Gated Ion Channels in Human Pancreatic Beta-Cells: Electrophysiological Characterization and Role in Insulin Secretion." *Diabetes* 57(6):1618–28.
- Bruns, D. and R. Jahn. 2002. "Molecular Determinants of Exocytosis." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 443(3):333–38.
- Cabrera, O., D. M. Berman, N. S. Kenyon, C. Ricordi, P. O. Berggren, and A. Caicedo. 2006. "The Unique Cytoarchitecture of Human Pancreatic Islets Has Implications for Islet Cell Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(7):2334–39.
- Caridha, D., D. Yourick, M. Cabezas, L. Wolf, T. H. Hudson, and G. S. Dow. 2008. "Mefloquine-Induced Disruption of Calcium Homeostasis in Mammalian Cells Is Similar to That Induced by Ionomycin." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(2):684–93.
- Catterall, W. A. 2011. "Voltage-Gated Calcium Channels." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(8):a003947.
- Catterall, W. A. and T. M. Swanson. 2015. "Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels." *Molecular Pharmacology* 88(1):141–50.
- Charvin, N., C. L'évêque, D. Walker, F. Berton, C. Raymond, M. Kataoka, Y. Shoji-Kasai, M. Takahashi, M. De Waard, and M. J. Seagar. 1997. "Direct Interaction of the Calcium Sensor Protein Synaptotagmin I with a Cytoplasmic Domain of the Alpha1A Subunit of the P/Q-Type Calcium Channel." *The EMBO Journal* 16(15):4591–96.

- Clement, J. P., K. Kunjilwar, G. Gonzalez, M. Schwanstecher, U. Panten, L. Aguilar-Bryan, and J. Bryan. 1997. "Association and Stoichiometry of K(ATP) Channel Subunits." *Neuron* 18(5):827–38.
- Coker, S. J., A. J. Batey, I. D. Lightbown, M. E. Díaz, and D. A. Eisner. 2000. "Effects of Mefloquine on Cardiac Contractility and Electrical Activity in Vivo, in Isolated Cardiac Preparations, and in Single Ventricular Myocytes." *British Journal of Pharmacology* 129:323–30.
- Cruikshank, S. J., M. Hopperstad, M. Younger, B. W. Connors, D. C. Spray, and M. Srinivas. 2004. "Potent Block of Cx36 and Cx50 Gap Junction Channels by Mefloquine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(33):12364–69.
- Curry, D. L., L. L. Bennett, and G. M. Grodsky. 1968. "Dynamics of Insulin Secretion by the Perfused Rat Pancreas." *Endocrinology* 83(3):572–84.
- Dadi, P. K., N. C. Viera, and D. A. Jacobson. 2014. "Pancreatic β -Cell-Specific Ablation of TASK-1 Channels Augments Glucose-Stimulated Calcium Entry and Insulin Secretion, Improving Glucose Tolerance." *Endocrinology* 155(10):3757–68.
- Darzynkiewicz, Z., F. Traganos, L. Staiano-Coico, J. Kapuscinski, and M. R. Melamed. 1982. "Interaction of Rhodamine 123 with Living Cells Studied by Flow Cytometry." *Cancer Research* 42(3):799–806.
- Davis, T. M. E., L. G. Dembo, S. A. Kaye-Eddie, B. E. J. Hewitt, R. G. Hislop, and K. T. Batty. 1996. "Neurological, Cardiovascular and Metabolic Effects of Mefloquine in Healthy Volunteers: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *British Journal of Clinical Pharmacology* 42(4):415–21.
- Detimary, P., J. C. Jonas, and J. C. Henquin. 1995. "Possible Links between Glucose-Induced Changes in the Energy State of Pancreatic B Cells and Insulin Release. Unmasking by Decreasing a Stable Pool of Adenine Nucleotides in Mouse Islets." *The Journal of Clinical Investigation* 96(4):1738–45.
- Dolenšek, J., M. Rupnik, and A. Stožer. 2015. "Structural Similarities and Differences between the Human and the Mouse Pancreas." *Islets* 7(1).
- Dow, G. S., T. H. Hudson, M. Vahey, and M. L. Koenig. 2003. "The Acute Neurotoxicity of Mefloquine May Be Mediated through a Disruption of Calcium Homeostasis and ER Function in Vitro." *Malaria Journal* 2(14).

- Düfer, M., D. Haspel, P. Krippeit-Drews, M. Kelm, F. Ranta, R. Nitschke, S. Ullrich, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan, and G. Drews. 2007. "The KATP Channel Is Critical for Calcium Sequestration into Non-ER Compartments in Mouse Pancreatic Beta Cells." *Cellular Physiology and Biochemistry* 20(1–4):65–74.
- Eddlestone, G. T., A. Gonçalves, J. A. Bangham, and E. Rojas. 1984. "Electrical Coupling between Cells in Islets of Langerhans from Mouse." *The Journal of Membrane Biology* 77(1):1–14.
- Egido, E. M., J. Rodriguez-Gallardo, R. A. Silvestre, and J. Marco. 2002. "Inhibitory Effect of Ghrelin on Insulin and Pancreatic Somatostatin Secretion." *European Journal of Endocrinology* 146(2):241–44.
- Emaus, R. K., R. Grunwald, and J. J. Lemasters. 1986. "Rhodamine 123 as a Probe of Transmembrane Potential in Isolated Rat-Liver Mitochondria: Spectral and Metabolic Properties." *Biochimica et Biophysica Acta* 850(3):436–48.
- Emerging Risk Factors Collaboration. 2011. "Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death." *New England Journal of Medicine* 364(9):829–41.
- Evans, W. H., E. De Vuyst, and L. Leybaert. 2006. "The Gap Junction Cellular Internet: Connexin Hemichannels Enter the Signalling Limelight." *The Biochemical Journal* 397(1):1–14.
- Fasciani, I., A. Temperán, L. F. Pérez-Atencio, A. Escudero, P. Martínez-Montero, J. Molano, J. M. Gómez-Hernández, C. L. Paino, D. González-Nieto, and L. C. Barrio. 2013. "Regulation of Connexin Hemichannel Activity by Membrane Potential and the Extracellular Calcium in Health and Disease." *Neuropharmacology* 75:479–90.
- Fluhler, E., V. G. Burnham, and L. M. Loew. 1985. "Spectra, Membrane Binding, and Potentiometric Responses of New Charge Shift Probes." *Biochemistry* 24(21):5749–55.
- Franckowiak, G., M. Bechem, M. Schramm, and G. Thomas. 1985. "The Optical Isomers of the 1,4-Dihydropyridine BAY K 8644 Show Opposite Effects on Ca Channels." *European Journal of Pharmacology* 114(2):223–26.
- Furukawa, T., T. Yamakawa, T. Midera, T. Sagawa, Y. Mori, and T. Nukada. 1999. "Selectivities of Dihydropyridine Derivatives in Blocking Ca²⁺ Channel Subtypes Expressed in *Xenopus* Oocytes." *Journal of Pharmacology and Experimental*

Therapeutics 291(2).

- Gautam, D., S. J. Han, A. Duttaroy, D. Mears, F. F. Hamdan, J. H. Li, Y. Cui, J. Jeon, and J. Wess. 2007. "Role of the M 3 Muscarinic Acetylcholine Receptor in Beta-Cell Function and Glucose Homeostasis." *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9(s2):158–69.
- Gee, K. R., K. A. Brown, W. N. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray, and I. Johnson. 2000. "Chemical and Physiological Characterization of Fluo-4 Ca(2+)-Indicator Dyes." *Cell Calcium* 27(2):97–106.
- Gembal, M., P. Gilon, and J. C. Henquin. 1992. "Evidence That Glucose Can Control Insulin Release Independently from Its Action on ATP-Sensitive K⁺ Channels in Mouse B Cells." *The Journal of Clinical Investigation* 89(4):1288–95.
- Ghosh, A., P. Ronner, E. Cheong, P. Khalid, and F. M. Matschinsky. 1991. "The Role of ATP and Free ADP in Metabolic Coupling during Fuel-Stimulated Insulin Release from Islet Beta-Cells in the Isolated Perfused Rat Pancreas." *The Journal of Biological Chemistry* 266(34):22887–92.
- Gildenhuis, J., C. J. Sammy, R. Müller, V. A. Streltsov, T. le Roex, D. Kuter, and K. A. de Villiers. 2015. "Alkoxide Coordination of Iron(III) Protoporphyrin IX by Antimalarial Quinoline Methanols: A Key Interaction Observed in the Solid-State and Solution." *Dalton Transactions* 44(38):16767–77.
- Goldman, D. E. 1943. "Potential, Impedance, and Rectification in Membranes." *The Journal of General Physiology* 27(1):37–60.
- Goodenough, D. A. and D. L. Paul. 2003. "Beyond the Gap: Functions of Unpaired Connexon Channels." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(4):285–94.
- Göpel, S. O., T. Kanno, S. Barg, J. Galvanovskis, and P. Rorsman. 1999. "Voltage-Gated and Resting Membrane Currents Recorded from B-Cells in Intact Mouse Pancreatic Islets." *The Journal of Physiology* 521 Pt 3:717–28.
- Göpel, S. O., T. Kanno, S. Barg, and P. Rorsman. 2000. "Patch-Clamp Characterisation of Somatostatin-Secreting Delta-Cells in Intact Mouse Pancreatic Islets." *Journal of Physiology-London* 528(3):497–507.
- Göpel, S. O., T. Kanno, S. Barg, X. G. Weng, J. Gromada, and P. Rorsman. 2000. "Regulation of Glucagon Release in Mouse δ -Cells by KATP Channels and

- Inactivation of TTX-Sensitive Na⁺ Channels." *The Journal of Physiology* 528(Pt 3):509–20.
- Göpel, S. O., Q. Zhang, L. Eliasson, X. S. Ma, J. Galvanovskis, T. Kanno, A. Salehi, and P. Rorsman. 2004. "Capacitance Measurements of Exocytosis in Mouse Pancreatic Alpha-, Beta- and Delta-Cells within Intact Islets of Langerhans." *The Journal of Physiology* 556(Pt 3):711–26.
- Gotoh, M., T. Maki, T. Kiyozumi, S. Satomi, and A. P. Monaco. 1985. "An Improved Method for Isolation of Mouse Pancreatic Islets." *Transplantation* 40(4):437–38.
- Gribble, F. M., T. M. E. Davis, C. E. Higham, A. Clark, and F. M. Ashcroft. 2000. "The Antimalarial Agent Mefloquine Inhibits ATP-Sensitive K-Channels." *British Journal of Pharmacology* 131(4):756–60.
- Griesche, N., G. Sanchez, C. Hermans, and O. Idevall-Hagren. 2019. "Cortical Mitochondria Regulate Insulin Secretion by Local Ca²⁺ Buffering in Rodent Beta Cells." *Journal of Cell Science* 132(9):jcs228544.
- Grimmsmann, T. and I. Rustenbeck. 1998. "Direct Effects of Diazoxide on Mitochondria in Pancreatic B-Cells and on Isolated Liver Mitochondria." *British Journal of Pharmacology* 123(5):781–88.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien. 1985. "A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties." *The Journal of Biological Chemistry* 260(6):3440–50.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. 1981. "Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 391(2):85–100.
- Harats, N., Z. Ackerman, and M. Shalit. 1984. "Quinine-Related Hypoglycemia." *The New England Journal of Medicine* 310(20):1331.
- Hedekov, C. J. 1980. "Mechanism of Glucose-Induced Insulin Secretion." *Physiological Reviews* 60(2):442–509.
- Heissig, H., K. A. Urban, K. Hastedt, B. J. Zünkler, and U. Panten. 2005. "Mechanism of the Insulin-Releasing Action of Alpha-Ketoisocaproate and Related Alpha-Keto Acid Anions." *Molecular Pharmacology* 68(4):1097–1105.

- Henquin, J. C. 2000. "Triggering and Amplifying Pathways of Regulation of Insulin Secretion by Glucose." *Diabetes* 49(11):1751–60.
- Henquin, J. C., S. Charles, M. Nenquin, F. Mathot, and T. Tamagawa. 1982. "Diazoxide and D600 Inhibition of Insulin Release: Distinct Mechanisms Explain the Specificity for Different Stimuli." *Diabetes* 31(9):776–83.
- Henquin, J. C., D. Dufrane, and M. Nenquin. 2006. "Nutrient Control of Insulin Secretion in Isolated Normal Human Islets." *Diabetes* 55(12):3470–77.
- Henquin, J. C. and H. P. Meissner. 1984. "Significance of Ionic Fluxes and Changes in Membrane Potential for Stimulus-Secretion Coupling in Pancreatic B-Cells." *Experientia* 40(10):1043–52.
- Hirano, Y., H. A. Fozzard, and C. T. January. 1989. "Characteristics of L- and T-Type Ca^{2+} Currents in Canine Cardiac Purkinje Cells." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 256(5):H1478–92.
- Hodson, D. J., R. K. Mitchell, E. A. Bellomo, G. Sun, L. Vinet, P. Meda, D. Li, W. H. Li, M. Bugliani, P. Marchetti, D. Bosco, L. Piemonti, P. Johnson, S. J. Hughes, and G. A. Rutter. 2013. "Lipotoxicity Disrupts Incretin-Regulated Human β Cell Connectivity." *Journal of Clinical Investigation* 123(10):4182–94.
- Horackova, M. 1985. "The Effect of D600 on Tonic Tension, Na^+ Inward Current, and Na^+ – Ca^{2+} Exchange in Frog Heart." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 63(11):1404–10.
- Horn, R. and A. Marty. 1988. "Muscarinic Activation of Ionic Currents Measured by a New Whole-Cell Recording Method." *The Journal of General Physiology* 92(2):145–59.
- Ivarsson, R., R. Quintens, S. Dejonghe, K. Tsukamoto, P. in 't Veld, E. Renström, and F. C. Schuit. 2005. "Redox Control of Exocytosis: Regulatory Role of NADPH, Thioredoxin, and Glutaredoxin." *Diabetes* 54(7):2132–42.
- Jacobs, E., A. Hoyer, R. Brinks, O. Kuss, and W. Rathmann. 2017. "Burden of Mortality Attributable to Diagnosed Diabetes: A Nationwide Analysis Based on Claims Data from 65 Million People in Germany." *Diabetes Care* 40(12):1703–9.
- Jacobs, E. and W. Rathmann. 2019. "Epidemiologie Des Diabetes in Deutschland." Pp. 9–16 in *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2020*. Kirchheim-Verlag.

- Johnson, L. V., M. L. Walsh, and L. B. Chen. 1980. "Localization of Mitochondria in Living Cells with Rhodamine 123." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(2):990–94.
- Kaesler, P. S., L. Deng, Y. Wang, I. Dulubova, X. Liu, J. Rizo, and T. C. Südhof. 2011. "RIM Proteins Tether Ca²⁺ Channels to Presynaptic Active Zones via a Direct PDZ-Domain Interaction." *Cell* 144(2):282–95.
- Kibbey, R. G., R. L. Pongratz, A. J. Romanelli, C. B. Wollheim, G. W. Cline, and G. I. Shulman. 2007. "Mitochondrial GTP Regulates Glucose-Stimulated Insulin Secretion." *Cell Metabolism* 5(4):253–64.
- Kilimnik, G., J. Jo, V. Periwal, M. C. Zielinski, and M. Hara. 2012. "Quantification of Islet Size and Architecture." *Islets* 4(2):167–72.
- Kimmich, G. A., J. Randles, and J. S. Brand. 1975. "Assay of Picomole Amounts of ATP, ADP, and AMP Using the Luciferase Enzyme System." *Analytical Biochemistry* 69(1):187–206.
- Knorr, A. M. 1995. "Why Is Nisoldipine a Specific Agent in Ischemic Left Ventricular Dysfunction?" *The American Journal of Cardiology* 75(13 SUPPL. 1):E36–40.
- de Kruijff, B. and R. A. Demel. 1974. "Polyene Antibiotic-Sterol Interactions in Membranes of *Acholeplasma Laidlawii* Cells and Lecithin Liposomes. 3. Molecular Structure of the Polyene Antibiotic-Cholesterol Complexes." *Biochimica et Biophysica Acta* 339(1):57–70.
- de Kruijff, B., W. J. Gerritsen, A. Oerlemans, R. A. Demel, and L. L. van Deenen. 1974. "Polyene Antibiotic-Sterol Interactions in Membranes of *Acholeplasma Laidlawii* Cells and Lecithin Liposomes. I. Specificity of the Membrane Permeability Changes Induced by the Polyene Antibiotics." *Biochimica et Biophysica Acta* 339(1):30–43.
- Kwon, Y. W. and D. J. Triggle. 1991. "Effects of Ca²⁺ Channel Ligands on [3H]QNB Binding at M1 and M3 Muscarinic Receptors." *General Pharmacology* 22(2):267–70.
- Lacinová, L. and N. Klugbauer. 2004. "Modulation of Gating Currents of the Ca(v)3.1 Calcium Channel by Alpha 2 Delta 2 and Gamma 5 Subunits." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 425(2):207–13.

- Lang, J. 1999. "Molecular Mechanisms and Regulation of Insulin Exocytosis as a Paradigm of Endocrine Secretion." *European Journal of Biochemistry* 259(1–2):3–17.
- Lebrun, P. and I. Atwater. 1985. "Effects of the Calcium Channel Agonist, BAY K 8644, on Electrical Activity in Mouse Pancreatic B-Cells." *Biophysical Journal* 48(6):919–30.
- Lenzen, S. and U. Panten. 1988. "Signal Recognition by Pancreatic B-Cells." *Biochemical Pharmacology* 37(3):371–78.
- Lernmark, A. 1974. "The Preparation of, and Studies on, Free Cell Suspensions from Mouse Pancreatic Islets." *Diabetologia* 10(5):431–38.
- Loewenstein, W. R. 1981. "Junctional Intercellular Communication: The Cell-to-Cell Membrane Channel." *Physiological Reviews* 61(4):829–913.
- López, M. G., R. I. Fonteríz, L. Gandía, M. de la Fuente, M. Villarroja, J. García-Sancho, and A. G. García. 1993. "The Nicotinic Acetylcholine Receptor of the Bovine Chromaffin Cell, a New Target for Dihydropyridines." *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 247(2):199–207.
- Maechler, P. and C. B. Wollheim. 1999. "Mitochondrial Glutamate Acts as a Messenger in Glucose-Induced Insulin Exocytosis." *Nature* 402(6762):685–89.
- Mandal, A., M. Shahidullah, and N. A. Delamere. 2015. "Calcium Entry via Connexin Hemichannels in Lens Epithelium." *Experimental Eye Research* 132:52–58.
- Maximov, A., J. Tang, X. Yang, Z. P. Pang, and T. C. Südhof. 2009. "Complexin Controls the Force Transfer from SNARE Complexes to Membranes in Fusion." *Science (New York, N.Y.)* 323(5913):516–21.
- McCulloch, L. J., M. van de Bunt, M. Braun, K. N. Frayn, A. Clark, and A. L. Gloyn. 2011. "GLUT2 (SLC2A2) Is Not the Principal Glucose Transporter in Human Pancreatic Beta Cells: Implications for Understanding Genetic Association Signals at This Locus." *Molecular Genetics and Metabolism* 104(4):648–53.
- McElroy, W. D. 1947. "The Energy Source for Bioluminescence in an Isolated System." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 33(11):342–45.
- Meglasson, M. D. and F. M. Matschinsky. 1984. "New Perspectives on Pancreatic Islet

- Glucokinase." *The American Journal of Physiology* 246(1 Pt 1):E1-13.
- Meglasson, M. D., J. Nelson, D. Nelson, and M. Erecinska. 1989. "Bioenergetic Response of Pancreatic Islets to Stimulation by Fuel Molecules." *Metabolism: Clinical and Experimental* 38(12):1188–95.
- Meissner, H. P. 1976. "Electrophysiological Evidence for Coupling between β Cells of Pancreatic Islets." *Nature* 262(5568):502–4.
- Métivier, D., B. Dallaporta, N. Zamzami, N. Larochette, S. A. Susin, I. Marzo, and G. Kroemer. 1998. "Cytofluorometric Detection of Mitochondrial Alterations in Early CD95/Fas/APO-1-Triggered Apoptosis of Jurkat T Lymphoma Cells. Comparison of Seven Mitochondrion-Specific Fluorochromes." *Immunology Letters* 61(2–3):157–63.
- Missan, S., P. Zhabyeyev, O. Dyachok, S. E. Jones, and T. F. McDonald. 2003. "Block of Cardiac Delayed-Rectifier and Inward-Rectifier K⁺ Currents by Nisoldipine." *British Journal of Pharmacology* 140(5):863–70.
- Morsi, M., T. Schulze, E. Früh, D. Brüning, U. Panten, and I. Rustenbeck. 2020. "Fresh and Cultured Mouse Islets Differ in Their Response to Nutrient Stimulation." *Endocrine Connections* 9(8):769–82.
- Mourad, N. I., M. Nenquin, and J. C. Henquin. 2010. "Metabolic Amplifying Pathway Increases Both Phases of Insulin Secretion Independently of β -Cell Actin Microfilaments." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 299(2):C389–98.
- Murphy, M. P. 1997. "Selective Targeting of Bioactive Compounds to Mitochondria." *Trends in Biotechnology* 15(8):326–30.
- Neher, E. and B. Sakmann. 1976. "Single-Channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle Fibres." *Nature* 260(5554):799–802.
- Neher, E., B. Sakmann, and J. H. Steinbach. 1978. "The Extracellular Patch Clamp: A Method for Resolving Currents through Individual Open Channels in Biological Membranes." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 375(2):219–28.
- Nowycky, M. C., A. P. Fox, and R. W. Tsien. 1985. "Three Types of Neuronal Calcium Channel with Different Calcium Agonist Sensitivity." *Nature* 316(6027):440–43.
- Numberger, M. and A. Draguhn. 1996. *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag.

- Orci, L., F. Malaisse-Lagae, M. Amherdt, M. Ravazzola, A. Weisswange, R. Dobbs, A. Perrelet, and R. Unger. 1975. "Cell Contacts in Human Islets of Langerhans." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 41(5):841–44.
- Owerbach, D., G. I. Bell, W. J. Rutter, and T. B. Shows. 1980. "The Insulin Gene Is Located on Chromosome 11 in Humans." *Nature* 286(5768):82–84.
- Panten, U., E. Früh, K. Reckers, and I. Rustenbeck. 2016. "Acute Metabolic Amplification of Insulin Secretion in Mouse Islets: Role of Cytosolic Acetyl-CoA." *Metabolism: Clinical and Experimental* 65(9):1225–29.
- Panten, U., H. Ishida, P. Schauder, H. Frerichs, and A. Hasselblatt. 1977. "A Versatile Microperfusion System." *Analytical Biochemistry* 82(2):317–26.
- Panten, U. and I. Rustenbeck. 2008. "Fuel-Induced Amplification of Insulin Secretion in Mouse Pancreatic Islets Exposed to a High Sulfonylurea Concentration: Role of the NADPH/NADP⁺ Ratio." *Diabetologia* 51(1):101–9.
- Panten, U., M. Schwanstecher, A. Wallasch, and S. Lenzen. 1988. "Glucose Both Inhibits and Stimulates Insulin Secretion from Isolated Pancreatic Islets Exposed to Maximally Effective Concentrations of Sulfonylureas." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 338(4):459–62.
- Petersmann, A., D. Müller-Wieland, U. A. Müller, R. Landgraf, M. Nauck, G. Freckmann, L. Heinemann, and E. Schleicher. 2019. "Definition, Klassifikation Und Diagnostik Des Diabetes Mellitus." *Diabetologie Und Stoffwechsel* 14(S 02):S111–18.
- Pizarro-Delgado, J., J. T. Deeney, B. E. Corkey, and J. Tamarit-Rodríguez. 2016. "Direct Stimulation of Islet Insulin Secretion by Glycolytic and Mitochondrial Metabolites in KCl-Depolarized Islets" edited by T. Cai. *PLOS ONE* 11(11):e0166111.
- Pizarro-Delgado, J., J. T. Deeney, R. Martín-del-Río, B. E. Corkey, and J. Tamarit-Rodríguez. 2015. "KCl -Permeabilized Pancreatic Islets: An Experimental Model to Explore the Messenger Role of ATP in the Mechanism of Insulin Secretion." edited by B. Wagner. *PloS One* 10(10):e0140096.
- Pizarro-Delgado, J., I. Fasciani, A. Temperan, M. Romero, D. González-Nieto, P. Alonso-Magdalena, A. Nualart-Marti, E. Estil'les, D. L. Paul, R. Martín-del-Río, E. Montanya, C. Solsona, A. Nadal, L. C. Barrio, and J. Tamarit-Rodríguez. 2014.

- "Inhibition of Connexin 36 Hemichannels by Glucose Contributes to the Stimulation of Insulin Secretion." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 306(12):E1354-66.
- Plant, T. D. 1988a. "Na⁺ Currents in Cultured Mouse Pancreatic B-Cells." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 411(4):429–35.
- Plant, T. D. 1988b. "Properties and Calcium-Dependent Inactivation of Calcium Currents in Cultured Mouse Pancreatic B-Cells." *The Journal of Physiology* 404(1988):731–47.
- Pørksen, N., M. Hollingdal, C. Juhl, P. Butler, J. D. Veldhuis, and O. Schmitz. 2002. "Pulsatile Insulin Secretion: Detection, Regulation, and Role in Diabetes." Pp. S245–54 in *Diabetes*. Vol. 51. American Diabetes Association.
- Quoix, N., R. Cheng-Xue, L. Mattart, Z. Zeinoun, Y. Guiot, M. C. Beauvois, J. C. Henquin, and P. Gilon. 2009. "Glucose and Pharmacological Modulators of ATP-Sensitive K⁺ Channels Control [Ca²⁺]_i by Different Mechanisms in Isolated Mouse α -Cells." *Diabetes* 58(2):412–21.
- Rabaglia, M. E., M. P. Gray-Keller, B. L. Frey, M. R. Shortreed, L. M. Smith, and A. D. Attie. 2005. "Alpha-Ketoisocaproate-Induced Hypersecretion of Insulin by Islets from Diabetes-Susceptible Mice." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 289(2):E218-24.
- Rae, J. L., K. Cooper, P. Gates, and M. Watsky. 1991. "Low Access Resistance Perforated Patch Recordings Using Amphotericin B." *Journal of Neuroscience Methods* 37(1):15–26.
- Randall, A. and R. W. Tsien. 1995. "Pharmacological Dissection of Multiple Types of Ca²⁺ Channel Currents in Rat Cerebellar Granule Neurons." *The Journal of Neuroscience* 15(4):2995–3012.
- Ravier, M. A., M. Güldenagel, A. Charollais, A. Gjnovci, D. Caille, G. Söhl, C. B. Wollheim, K. Willecke, J. C. Henquin, and P. Meda. 2005. "Loss of Connexin36 Channels Alters β -Cell Coupling, Islet Synchronization of Glucose-Induced Ca²⁺ and Insulin Oscillations, and Basal Insulin Release." *Diabetes* 54(6):1798–1807.
- Ribalet, B. and P. M. Beigelman. 1980. "Calcium Action Potentials and Potassium Permeability Activation in Pancreatic β -Cells." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 8(2).

- Rorsman, P. and F. M. Ashcroft. 2018. "Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men." *Physiological Reviews* 98(1):117–214.
- Rorsman, P. and G. Trube. 1986. "Calcium and Delayed Potassium Currents in Mouse Pancreatic Beta-Cells under Voltage-Clamp Conditions." *The Journal of Physiology* 374:531–50.
- Rustenbeck, I. and H. G. Joost. 2017. "Pharmakologie Des Energiestoffwechsels - Pharmakotherapie Des Diabetes Mellitus Und Der Adipositas." Pp. 545–69 in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (12. Auflage)*, Elsevier GmbH.
- Ryle, A. P., F. Sanger, L. F. Smith, and R. Kitai. 1955. "The Disulphide Bonds of Insulin." *The Biochemical Journal* 60(4):541–56.
- Sanger, F. and E. O. P. Thompson. 1953. "The Amino-Acid Sequence in the Glycyl Chain of Insulin. II. The Investigation of Peptides from Enzymic Hydrolysates." *The Biochemical Journal* 53(3):366–74.
- Sanger, F. and H. Tuppy. 1951. "The Amino-Acid Sequence in the Phenylalanyl Chain of Insulin. II. The Investigation of Peptides from Enzymic Hydrolysates." *The Biochemical Journal* 49(4):481–90.
- Sanguinetti, M. C. and R. S. Kass. 1984. "Voltage-Dependent Block of Calcium Channel Current in the Calf Cardiac Purkinje Fiber by Dihydropyridine Calcium Channel Antagonists." *Circulation Research* 55(3):336–48.
- Santos, R. M., L. M. Rosario, A. Nadal, J. Garcia-Sancho, B. Soria, and M. Valdeolmillos. 1991. "Widespread Synchronous $[Ca^{2+}]_i$ Oscillations Due to Bursting Electrical Activity in Single Pancreatic Islets." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 418(4):417–22.
- Scemes, E., D. C. Spray, and P. Meda. 2009. "Connexins, Pannexins, Innexins: Novel Roles of 'Hemi-Channels'." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 457(6):1207–26.
- Schock, S. C., D. Leblanc, A. M. Hakim, and C. S. Thompson. 2008. "ATP Release by Way of Connexin 36 Hemichannels Mediates Ischemic Tolerance in Vitro." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368(1):138–44.
- Schwabe, U., D. Paffrath, W. D. Ludwig, and J. Klauber. 2019. *Arzneiverordnungs-*

Report 2019. Springer Verlag.

- Serre-Beinier, V., S. Le Gurun, N. Belluardo, A. Trovato-Salinaro, A. Charollais, J. A. Haefliger, D. F. Condorelli, and P. Meda. 2000. "Cx36 Preferentially Connects Beta-Cells within Pancreatic Islets." *Diabetes* 49(5):727–34.
- Smith, P. A., F. M. Ashcroft, and P. Rorsman. 1990. "Simultaneous Recordings of Glucose Dependent Electrical Activity and ATP-Regulated K(+)-Currents in Isolated Mouse Pancreatic Beta-Cells." *FEBS Letters* 261(1):187–90.
- Smith, P. A., K. Bokvist, and P. Rorsman. 1989. "Demonstration of A-Currents in Pancreatic Islet Cells." *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 413(4):441–43.
- Söllner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, and J. E. Rothman. 1993. "SNAP Receptors Implicated in Vesicle Targeting and Fusion." *Nature* 362(6418):318–24.
- Speier, S., A. Gjinovci, A. Charollais, P. Meda, and M. Rupnik. 2007. "Cx36-Mediated Coupling Reduces β -Cell Heterogeneity, Confines the Stimulating Glucose Concentration Range, and Affects Insulin Release Kinetics." *Diabetes* 56(4):1078–86.
- Spray, D. C., Z. C. Ye, and B. R. Ransom. 2006. "Functional Connexin 'Hemichannels': A Critical Appraisal." *Glia* 54(7):758–73.
- Srinivas, M., D. P. Calderon, J. Kronengold, and V. K. Verselis. 2006. "Regulation of Connexin Hemichannels by Monovalent Cations." *Journal of General Physiology* 127(1):67–75.
- Stannard, J. N. and B. L. Horecker. 1948. "The in Vitro Inhibition of Cytochrome Oxidase by Azide and Cyanide." *The Journal of Biological Chemistry* 172(2):599–608.
- Steiner, D. F., D. Cunningham, L. Spigelman, and B. Aten. 1967. "Insulin Biosynthesis: Evidence for a Precursor." *Science (New York, N.Y.)* 157(3789):697–700.
- Stiles, L. and O. S. Shirihai. 2012. "Mitochondrial Dynamics and Morphology in Beta-Cells." *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 26(6):725–38.
- Straub, S. G. and G. W. G. Sharp. 2002. "Glucose-Stimulated Signaling Pathways in

- Biphasic Insulin Secretion." *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 18(6):451–63.
- Straub, S. G. and G. W. G. Sharp. 2004. "Hypothesis: One Rate-Limiting Step Controls the Magnitude of Both Phases of Glucose-Stimulated Insulin Secretion." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 287(3):C565-71.
- Strehler, B. L. and J. R. Totter. 1952. "Firefly Luminescence in the Study of Energy Transfer Mechanisms. I. Substrate and Enzyme Determination." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 40(1):28–41.
- Südhof, T. C. 2013. "Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle." *Neuron* 80(3):675–90.
- Takahashi, M., M. J. Seagar, J. F. Jones, B. F. Reber, and W. A. Catterall. 1987. "Subunit Structure of Dihydropyridine-Sensitive Calcium Channels from Skeletal Muscle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(15):5478–82.
- Tang, G., L. Zhang, G. Yang, L. Wu, and R. Wang. 2013. "Hydrogen Sulfide-Induced Inhibition of L-Type Ca²⁺ Channels and Insulin Secretion in Mouse Pancreatic Beta Cells." *Diabetologia* 56(3):533–41.
- Thorens, B. 2015. "GLUT2, Glucose Sensing and Glucose Homeostasis." *Diabetologia* 58(2):221–32.
- Tönnies, T., S. Röckl, A. Hoyer, C. Heidemann, J. Baumert, Y. Du, C. Scheidt-Nave, and R. Brinks. 2019. "Projected Number of People with Diagnosed Type 2 Diabetes in Germany in 2040." *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association* 36(10):1217–25.
- Trube, G., P. Rorsman, and T. Ohno-Shosaku. 1986. "Opposite Effects of Tolbutamide and Diazoxide on the ATP-Dependent K⁺ Channel in Mouse Pancreatic Beta-Cells." *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* 407(5):493–99.
- Vaupel, P., H. G. Schaible, and E. Mutschler. 2015. "Pankreashormone Und Blutzuckerregulation." Pp. 592–602 in *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen (7. Auflage)*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Vignali, S., V. Leiss, R. Karl, F. Hofmann, and A. Welling. 2006. "Characterization of Voltage-Dependent Sodium and Calcium Channels in Mouse Pancreatic A- and B-

- Cells." *The Journal of Physiology* 572(Pt 3):691–706.
- Vorndran, C., A. Minta, and M. Poenie. 1995. "New Fluorescent Calcium Indicators Designed for Cytosolic Retention or Measuring Calcium near Membranes." *Biophysical Journal* 69(5):2112–24.
- De Vos, A., H. Heimberg, E. Quartier, P. Huypens, L. Bouwens, D. Pipeleers, and F. Schuit. 1995. "Human and Rat Beta Cells Differ in Glucose Transporter but Not in Glucokinase Gene Expression." *The Journal of Clinical Investigation* 96(5):2489–95.
- Weiss, M., D. F. Steiner, and L. H. Philipson. 2000. *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships*.
- WHO. 2019. "Classification of Diabetes Mellitus 2019."
- Wierup, N., H. Svensson, H. Mulder, and F. Sundler. 2002. "The Ghrelin Cell: A Novel Developmentally Regulated Islet Cell in the Human Pancreas." *Regulatory Peptides*.
- Willenborg, M., M. Belz, K. Schumacher, A. Paufler, K. Hatlapatka, and I. Rustenbeck. 2012. "Ca(2+)-Dependent Desensitization of Insulin Secretion by Strong Potassium Depolarization." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 303(2):E223–33.
- Yang, S. N. and P. O. Berggren. 2005. "CaV2.3 Channel and PKC λ : New Players in Insulin Secretion." *The Journal of Clinical Investigation* 115(1):16–20.
- Yang, S. N. and P. O. Berggren. 2006. "The Role of Voltage-Gated Calcium Channels in Pancreatic Beta-Cell Physiology and Pathophysiology." *Endocrine Reviews* 27(6):621–76.
- Zawalich, W. S., H. Yamazaki, and K. C. Zawalich. 2008. "Biphasic Insulin Secretion from Freshly Isolated or Cultured, Perfused Rodent Islets: Comparative Studies with Rats and Mice." *Metabolism: Clinical and Experimental* 57(1):30–39.
- Zhang, Q., M. V Chibalina, M. Bengtsson, L. N. Groschner, R. Ramracheya, N. J. G. Rorsman, V. Leiss, M. A. Nassar, A. Welling, F. M. Gribble, F. Reimann, F. Hofmann, J. N. Wood, F. M. Ashcroft, and P. Rorsman. 2014. "Na⁺ Current Properties in Islet α - and β -Cells Reflect Cell-Specific Scn3a and Scn9a Expression." *The Journal of Physiology* 592(21):4677–96.

- Zhang, Q., J. Galvanovskis, F. Abdulkader, C. Partridge, S. O. Göpel, L. Eliasson, and P. Rorsman. 2008. "Cell Coupling in Mouse Pancreatic β -Cells Measured in Intact Islets of Langerhans." *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 366(1880):3503–23.
- Zidovetzki, R., I. W. Sherman, P. A. Maguire, and H. De Boeck. 1990. "A Nuclear Magnetic Resonance Study of the Interactions of the Antimalarials Chloroquine, Quinacrine, Quinine and Mefloquine with Lipids Extracted from Normal Human Erythrocytes." *Molecular and Biochemical Parasitology* 38(1):33–39.
- Zünkler, B. J., S. Lenzen, K. Manner, U. Panten, and G. Trube. 1988. "Concentration-Dependent Effects of Tolbutamide, Meglitinide, Glipizide, Glibenclamide and Diazoxide on ATP-Regulated K^+ Currents in Pancreatic B-Cells." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 337(2):225–30.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------------------------|--|
| [Ca ²⁺] _i | Freie, cytosolische Calciumionenkonzentration |
| Å | Angström (1 Å = 0,1 nm) |
| ACh | Acetylcholin |
| AM | Acetoxymethylester |
| AS | Aminosäure |
| ATP/ADP/AMP | Adenosintri- / -di- / -monophosphat |
| CoA | CoenzymA |
| Bay K | (±)-Bay K8644 (1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-5-nitro-4-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-3-pyridincarboxylsäuremethylester) |
| CC | <i>Current Clamp</i> (Stromklemme) |
| DHP | Dihydropyridin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EPC7/9 | <i>Extracellular patch clamp amplifier</i> (Patch-Clamp-Verstärker) |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| EZ | Extrazelluläre Lösung |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum) |
| GIP | Glucoseabhängiges, insulinotropes Peptid (veraltet: gastrointestinales inhibitorisches Peptid) |
| GLP-1 | <i>Glucagon-like peptide 1</i> |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure |
| HVA | <i>High-voltage activated (Calcium channel)</i> |
| IVA | <i>Intermediate-voltage activated (Calcium channel)</i> |
| K _{ATP} -Kanal | ATP-sensitiver bzw. -abhängiger Kaliumkanal |
| K _{ir} 6.2 | <i>inwardly rectifying</i> (einwärtsgleichrichtender) Kaliumkanal, Subtyp 6.2 |
| KR | Krebs-Ringer-Lösung |
| LVA | <i>Low-voltage activated (Calcium channel)</i> |
| MFQ | Mefloquin |
| NIS | Nisoldipin |
| NMRI-Maus | Labormaus-Stamm des <i>Naval Medical Research Intitute</i> |
| Pen/Strep | Penicillin / Streptomycin |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| pF | Picofarad (10 ⁻¹² Farad) |
| Rh123 | Rhodamin123 |

| | |
|---------|---|
| ROI | <i>Region of interest</i> |
| rpm | <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes) |
| SNAP-25 | <i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein-25</i> |
| SNARE | <i>SNAP receptor</i> |
| SU | <i>sulfonylurea</i> (Sulfonylharnstoff, hier meistens Tolbutamid) |
| SUR1 | <i>sulfonylurea receptor</i> (Sulfonylharnstoffrezeptor, Subtyp1) |
| TEA | Tetraethylammoniumchlorid |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TTX | Tetrodotoxin |
| VAMP-2 | <i>vesicle-associated membrane protein-2</i> |
| VC | <i>Voltage Clamp</i> (Spannungsklemme) |
| VDCC | <i>voltage-dependent calcium channel</i> (spannungsabhängiger Calciumkanal) |
| ZET | Zentrale Einrichtung für Tierhaltung der TU Braunschweig |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abbildung 1.1: Hemichannels und <i>Gap junctions</i> | 7 |
| Abbildung 1.2: Primärstruktur von (Pro-)Insulin | 9 |
| Abbildung 1.3: Mechanismen der Glucose-induzierten Insulinfreisetzung. | 11 |
| Abbildung 1.4: Struktur und Funktion spannungsabhängiger Calciumkanäle..... | 12 |
| Abbildung 1.5: Mechanismen der Exozytose: Ausbildung des SNARE-Komplexes und Öffnung der Fusionspore. | 14 |
| Abbildung 1.6: Darstellung der glucoseabhängigen metabolischen Amplifikation unter Einsatz von Kaliumdepolarisation und Diazoxid. | 17 |
| Abbildung 1.7: Calcium-vermittelter Effekt von 40 mM Kaliumchlorid auf die Insulinsekretion..... | 19 |
| Abbildung 1.8: Strukturformel von Mefloquin | 20 |
| Abbildung 1.9: Strukturformel von Diazoxid | 21 |
| Abbildung 3.1: Collagenaseinjektion in den Gallengang. | 36 |
| Abbildung 3.2: Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik..... | 40 |
| Abbildung 3.3: Grundlegende Komponenten des Patch-Clamp-Set-ups..... | 41 |
| Abbildung 3.4: EPC7-Set-up..... | 43 |
| Abbildung 3.5: Zellbad mit Plexiglaseinsatz für Patch-Clamp-Versuche. | 45 |
| Abbildung 3.6: EPC9-Set-up..... | 46 |
| Abbildung 3.7: Stimulationsprotokoll (EPC7). | 51 |
| Abbildung 3.8: Stimulationsprotokoll und beispielhafte Registrierungen für Test auf β -Zell- Na^+ -Kanal. | 54 |
| Abbildung 3.9: Stimulationsprotokoll und Auswertung der Voltage Clamp-Versuche zur Untersuchung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (VDCC)..... | 56 |
| Abbildung 3.10: Struktur von Fura-2 LeakRes und Absorptionsspektren in Abhängigkeit von der freien Calciumionenkonzentration | 57 |
| Abbildung 3.11: Struktur und Absorptions-/Emissionsspektrum von Fluo-4 | 58 |
| Abbildung 3.12: Prinzip der Fluoreszenzmessung mit dichroitischen Spiegeln | 59 |
| Abbildung 3.13: Perifusionskammer für Fura-Messungen. | 61 |
| Abbildung 3.14: Struktur und Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Rhodamin123..... | 63 |
| Abbildung 3.15: Perifusionsanlage | 65 |
| Abbildung 3.16: Perifusionskammer für Messungen der Insulinsekretionsrate..... | 66 |
| Abbildung 4.1: Effekte der Calciumkanalblocker Nifedipin, D600 und CoCl_2 auf das Membranpotential einzelner β -Zellen nach Depolarisation mit 40 mM KCl, Tolbutamid und TEA | 70 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 4.2: Effekt von Nifedipin und CoCl_2 auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Anwesenheit von 40 mM KCl, Tolbutamid und TEA. | 72 |
| Abbildung 4.3: Simultane Messung der Effekte von Tolbutamid und 15 bzw. 40 mM KCl auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und Membranpotential..... | 73 |
| Abbildung 4.4: Beeinflussung der Calciummessung bei simultaner Messung des Membranpotentials im <i>Current Clamp</i> -Modus..... | 74 |
| Abbildung 4.5: Veränderung der Tolbutamid-induzierten Aktionspotentiale durch steigende extrazelluläre Kaliumkonzentrationen..... | 75 |
| Abbildung 4.6: Veränderung der Tolbutamid-induzierten Aktionspotentiale durch (\pm)-Bay K8644 | 76 |
| Abbildung 4.7: Effekt des direkten Calciumkanalöffners Bay K auf die Aktivität von VDCC | 77 |
| Abbildung 4.8: Kein direkter Effekt von 40 mM Kalium auf die Aktivität der VDCC | 78 |
| Abbildung 4.9: Differenzierung der Effekte von 40 mM Kalium | 79 |
| Abbildung 4.10: Depolarisation der β -Zellplasmamembran durch Mefloquin und Tolbutamid..... | 81 |
| Abbildung 4.11: Mefloquin hemmt Tolbutamid-induzierte Aktionspotentiale..... | 82 |
| Abbildung 4.12: Mefloquin verhindert das Entstehen Tolbutamid-induzierter Aktionspotentiale | 83 |
| Abbildung 4.13: Hemmung der VDCC durch Mefloquin und Nisoldipin - Stromkurven..... | 84 |
| Abbildung 4.14: Hemmung der VDCC durch Mefloquin und Nisoldipin - Auswertung .. | 85 |
| Abbildung 4.15: Kinetik der Calciumkanalblockade mit Mefloquin vs. Nisoldipin..... | 86 |
| Abbildung 4.16: Induktion von Auswärtsströmen durch Mefloquin in Anwesenheit von Nisoldipin nicht nachweisbar..... | 88 |
| Abbildung 4.17: Antagonismus zwischen Mefloquin und Bay K..... | 89 |
| Abbildung 4.18: Mefloquin blockiert den Tolbutamid-induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ | 90 |
| Abbildung 4.19: Mefloquin hemmt die depolarisationsinduzierte Insulinsekretion | 91 |
| Abbildung 4.20: Mefloquin hemmt den depolarisations- aber nicht den Glucose-induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der Insulinsekretion | 93 |
| Abbildung 4.21: Unterdrückung von Glucose-induzierten Aktionspotentialen, aber Erhalt der Kalium-induzierten Depolarisation in Anwesenheit von Diazoxid..... | 94 |
| Abbildung 4.22: Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch Diazoxid trotz Gegenwart von 15 mM KCl..... | 95 |
| Abbildung 4.23: Teilweise Reduktion der durch Glucose und Kalium erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Diazoxid..... | 96 |
| Abbildung 4.24: Depolarisation der Mitochondrienmembran durch Diazoxid. | 97 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 4.25: Beeinflussung des Adeninnucleotidegehalts durch Diazoxid..... | 98 |
|---|----|

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

| | |
|---------|--|
| Name | Nele Seemann geb. Görgler |
| Geburt | 19.08.1988 in Hannover, Eltern: Hartmut Görgler und Dr. Saskia Uhde-Görgler |
| Familie | verheiratet mit Lasse Seemann (19.02.2016), Kinder: Wenke (2017) und Bjarne (2018) |

Ausbildung

| | |
|-------------|--|
| 1994 – 1998 | Besuch der Grundschule Fritz-Reuter-Schule, Kiel |
| 1998 – 2007 | Besuch des Gymnasiums Hebbelschule, Kiel, Abschluss Abitur |
| 2007 – 2012 | Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig |
| 2012 – 2013 | Je ein halbjähriges Pharmaziepraktikum bei Schaper & Brümmer in Salzgitter-Ringelheim und in der Welfenapotheke in Braunschweig |
| Juni 2013 | Staatsexamen und Erteilung der Approbation als Apothekerin |
| seit 2013 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ingo Rustenbeck) |

Veröffentlichungen

Belz M., Willenborg M., **Görgler N.**, Hamada A., Schumacher K., Rustenbeck I.: Insulinotropic effect of high potassium concentration beyond plasma membrane depolarization. Am J Physiol Endocrinol Metab 306(6): E697-E706 (2014)

Görgler N., Belz M., Willenborg M., Schumacher K., Rustenbeck I.: Insulinotropic effect of high potassium concentration beyond plasma membrane depolarization.

(Poster) Diabetologie und Stoffwechsel 9 (S01); P65, 49. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG), Berlin (2014)

Görgler N., Willenborg M., Schumacher K., Rustenbeck I.: Diazoxide as a tool to investigate metabolic amplification of insulin secretion - a reconsideration. (Vortrag) Diabetologia 57 (Suppl1): S64, 50. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD), Wien (2014)

Görgler N., Willenborg M., Schumacher K., Welling A., Rustenbeck I.: Effects of K^+ depolarization on insulin secretion and beta cell Ca^{2+} influx. (Vortrag) 12th German Pancreatic Islet Workshop, Bremen (2015)

Görgler N., Willenborg M., Schumacher K., Welling A., Rustenbeck I.: Modification of the Ca^{2+} influx pattern of the pancreatic beta cell by high extracellular potassium. (Poster) Diabetologie und Stoffwechsel 10 (S01); P256, 50. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG), Berlin (2015)

Görgler N., Willenborg M., Schumacher K., Welling A., Rustenbeck I.: Beta cell action potentials and Ca^{2+} currents during K^+ . (Poster) Diabetologia 58 (Suppl 1): S208, 51. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD), Stockholm (2015)

Görgler N., Welling A., Rustenbeck I.: Mefloquine, a useful tool to investigate hemichannel function in pancreatic beta cells? (Poster) Diabetologie und Stoffwechsel 11 (S01); P150, 51. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG), Berlin (2016)

Seemann N., Welling A., Rustenbeck I.: The inhibitor of connexin 36 hemichannels, mefloquine, affects K_{ATP} channels and L-type Ca^{2+} channels in pancreatic beta cells. (Poster) Diabetologia 59 (Suppl 1): S191–S192, 52. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD), München (2016)

Schulze T., Morsi M., Reckers K., Brüning D., **Seemann N.**, Panten U., Rustenbeck I.: Metabolic amplification of insulin secretion is differentially desensitized by depolarization in the absence of exogenous fuels. Metabolism 67:1-13 (2017)

Seemann N., Welling A., Rustenbeck I.: The inhibitor of connexin Cx36 channels, mefloquine, inhibits voltage-dependent Ca^{2+} channels and insulin secretion. Mol Cell Endocrinol 472: 97-106 (2018)